

**“ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN LA
METILACIÓN DEL DNA INDUCIDOS POR LA DIABETES Y SUS
POSIBLES MECANISMOS”**

ANGELINA PERNA CHAUX

Microbióloga, MA.

UNIVERSIDAD NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, 2016

Tesis presentada por **ANGELINA PERNA CHAUX**, para optar al grado de **Maestría en Ciencias con Énfasis en Genética Humana** de la *Universidad Nuestra Señora del Rosario*.



El trabajo se realizó en el **Laboratorio de Genética Humana** de la *Universidad de los Andes*, bajo la dirección de los Doctores Valeriano López Segura y Helena Groot de Restrepo.

DIRECTOR DE TESIS

Valeriano López Segura, M.Sc., Ph.D.

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dra. Helena Groot de Restrepo, M.Sc.

1. *Laboratorio de Genética Humana, Universidad de los Andes.*
2. *Facultad de Medicina, Universidad Nuestra Señora del Rosario.*

Bogotá, 2016

Dr. Valeriano López Segura, M.Sc., Ph.D.

Biólogo

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Helena Groot Restrepo, M.Sc.

Bacterióloga

CO-DIRECTORA DE TESIS

Dra. Claudia Tamar Silva Aldana, M.Sc., Ph.D.

JURADO 1

Dra. Alba Alicia Trespalacios, M.Sc., Ph.D.

JURADO 2

Dedicatoria

A Dios por guiar y cuidar cada uno de mis pasos. Por darme una vida llena de amor y bendiciones. A mi familia por ser el motor de mi existir y mi apoyo incondicional. A mi hija María Antonella por hacer de mis días los más alegres. A mi padre que en paz descansas, esto es para ti.

AGRADECIMIENTOS

A mi papá el Dr. Aníbal Perna Mazzeo, por cultivarme el amor por la naturaleza y enseñarme el respeto por la vida, los organismos vivos y la humanidad. Le doy gracias a mi padre por inculcarme esta hermosa pasión.*

A la Universidad de los Andes por cobijarme de nuevo y permitirme realizar la investigación de mi tesis en sus instalaciones.

Al Dr. Valeriano López por su valiosa dirección y dedicación. Lo recordaré siempre por enseñarme epigenética y ampliar mi visión de la genética humana.

A la Dra. Helena Groot por el apoyo incondicional de un gran ser humano que busca el bienestar de sus estudiantes. Gracias por la oportunidad que me brindó para hacer parte de este grupo de investigación.

Al programa de Diabetes de la Fundación Santa Fe por esta oportunidad. A los pacientes por su interés en participar y ser parte de esta investigación.

A la Universidad del Rosario por recibirme como su estudiante y enseñarme nuevos conocimientos, que no sólo me fomentaron mi crecimiento profesional sino también mi crecimiento personal.

A mis profesores el Dr. Carlos Restrepo, la Dra. Nora Contreras, la Dra. Dora Fonseca, la Dra. Heidi Mateus, la Dra. Claudia Silva, Dr. Carlos Prada, Dr. Paul L, Dra Luisa Matheus y la Dra Sandra; a cada uno de ustedes por su valiosa dedicación y apoyo como docentes que hicieron parte de mi formación académica. Siempre estaré muy agradecida por sus enseñanzas.

A mis compañeras de la Maestría en Ciencias de la Universidad del Rosario a Laura Rico, Marcela Gálvez, Karina Mancera, y Catalina Hurtado por el tiempo compartido en los tres años.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes a Diana Polanía, Nicolás Rojas, Jairo Pinzón Carolina Muñoz, Diana Narváez, Daniela Castiblanco, Sandra Camargo, Luz Adriana Pérez, María Fernanda Jácome, Katherine Duque, Adriana Robayo, Angélica Díaz y Andrés Hernández por el apoyo incondicional y el tiempo que compartimos trabajando.

A mi grupo de trabajo Jairo, Nicolás, y Diana P, con ustedes aprendí nuevas técnicas y les agradezco por su dedicación y compromiso, realizando así un gran trabajo en equipo.

A mi esposo Juan David Jaramillo por su incondicional apoyo durante mis estudios. Fuiste mi fuerza y empuje en los momentos buenos y no tan buenos, animándome siempre en cumplir mis sueños y alcanzar mis metas. A mi hija María Antonella, iluminaste mi existir e hiciste de mis días los más felices.

A mi familia, mi mama Luz María Chaux, le agradezco por enseñarme perseverar y luchar cada día. Mi hermana Isabella Perna y mi sobrina Luciana Cárdenas por esperar y apoyarme en el tiempo de mis estudios. A Yolanda Moncayo, Edgar Jaramillo y Catalina Jaramillo por apoyarme en este proceso. A mi amiga y hermana del alma Julieta Villegas por acompañarme.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	12
SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	13
I. INTRODUCCIÓN	16
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos	20
V. MARCO TEÓRICO	21
5.1 EPIGENÉTICA	21
5.1.1 Historia de la epigenética	21
5.1.2 Concepto de epigenética	21
5.1.3 Los cuatro pilares de la epigenética	21
5.1.3.1 Remodelación de cromatina	22
5.1.3.2 Modificación de las colas de histonas	22
5.1.3.3 RNAs no codificantes	23
5.1.3.4 Modificación covalente del DNA	23
5.1.3.4 .1 El papel de las CpGs y la metilación del DNA	24
5.1.3.4 .2 Enzimas encargadas de la metilación del DNA	26
A. DNA metiltransferasas	26
a. DNMT1: DNA (citosina-5-)-metiltransferasa 1	28
B. UHRF1 (<i>Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains</i>)	28
5.1.4 Desmetilación activa y pasiva	29
5.1.4.1 Maquinaria de desmetilación activa	29
A. Glicosilasas ten-eleven translocasas (TETs)	30
a. <i>TET1</i>	31
B. AID/APOBEC	31
C. TDG	31
D. MBD4	32
5.1.5 Ciclo de un carbono, clave en la metilación	32
5.2 DIABETES MELLITUS COMO MODELO BIOLÓGICO	33
5.2.1 Concepto actual de la diabetes mellitus	33
5.2.2 Causas de la diabetes	33
5.2.3 Mayores complicaciones en la diabetes	34
5.2.4 Clasificación de la diabetes	35
A. Diabetes Mellitus tipo 1	36
B. Diabetes Mellitus tipo 2	36
5.2.5 Criterios de Diagnóstico	38
5.3 OXIDACIÓN CELULAR RELACIONADA A LA DIABETES	39
5.3.1 Rol del estrés oxidativo	39
5.3.2 Especies reactivas de oxígeno	39
5.3.3 Cadena transportadora de electrones y la formación de ROS	40
5.3.4 Aumento de oxidación en caso de hiperglucemia	40
5.3.5 Complicaciones de la DM por baja regulación oxido reducción y la supervivencia celular	41
5.3.6 Vías bioquímicas afectadas por ROS	42
5.3.6.1 Piezas del rompecabezas descritas por Brownlee	42
5.3.6.2 Hiperglucemia y daño microvascular	43

A. Incremento de la vía de los polioles	43
B. Precursores de AGEs	43
C. Incremento de la expresión de receptores AGEs y sus ligando	44
D. Activación de PKC	44
E. Incremento de hexosaminas	45
5.3.6.3 La hiperglucemia induce la activación de las cinco vías, inhibiendo a GAPDH y activando a ADP-ribosa.	45
5.3.6.4 Resistencia a la insulina y daño macrovascular	46
5.4 EPIGENÉTICA Y DIABETES	48
5.4.1 La problemática de la epigenética en la diabetes	48
5.5.2 Memoria epigenética hiperglucémica	49
VI. METODOLOGÍA	50
6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	50
A. Criterios de inclusión	50
B. Criterios de exclusión	50
6.2 RECLUTAMIENTO Y RECOLECCIÓN DE LA HISTORIA CLÍNICA DE LOS PACIENTES	51
6.3 MÉTODOS DE LABORATORIO	51
6.3.1 Obtención de la muestra	51
6.3.2 Pruebas clínicas de laboratorio y hemoglobina glucosilada (HbA1c)	51
6.3.3 Extracción de DNA	51
6.3.4 Extracción de RNA	52
6.3.5 Cuantificación por Nanodrop	52
6.3.6 Microelisas de metilación e hidroximetilación	52
6.3.7 RT-qPCR	54
6.3.7.1 Diseño de cebadores	54
6.3.7.2 Estandarización de cebadores por PCR convencional	55
6.3.7.3 Síntesis de la primera hebra de cDNA	55
6.3.7.4 Reacción de PCR convencional para el control positivo GAPDH	56
6.3.7.5 Gel de electroforesis en agarosa para los controles de GAPDH	57
6.3.7.6 Reacción de qRT-PCR de los genes DNMT1 y TET1	57
6.3.8 Microarreglos	59
6.4 DIAGRAMA METODOLÓGICO	61
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y BIOINFORMÁTICOS	62
6.5.1 Análisis estadísticos de las microelisas	62
6.5.2 Análisis estadísticos de RT-qPCR	63
6.5.3 Análisis estadísticos y bioinformáticos de microarreglos	63
VII. ASPECTOS ÉTICOS	65
VIII. RESULTADOS	69
8.1 EFECTO DEL CONTROL METABÓLICO EN LA METILACIÓN E HIDROXIMETILACIÓN DEL DNA EN T2DM	69
8.2 SEXO Y FACTORES DE ESTILO DE VIDA	71
8.3 EDAD Y DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD	74
8.4 qRT-PCR DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DESMETILACIÓN DEL DNA	75
8.5 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LOS NIVELES DE METILACIÓN EN TEJIDOS AFECTADOS POR LA DM	76
8.6 HIDROXIMETILACIÓN Y DIABETES: POSIBLES MECANISMOS DE DESMETILACIÓN	77
8.7 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS	81
IX. DISCUSIÓN	82
9.1 EFECTO DEL CONTROL METABÓLICO EN LA METILACIÓN E HIDROXIMETILACIÓN DEL DNA EN T2DM	82
9.2 EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN RUTAS DE DESMETILACIÓN	83

9.3 UN POSIBLE MECANISMO NUEVO DE DESMETILACIÓN EN ESTADOS DE ENFERMEDAD	84
9.4 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS Y SU EFECTO SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD	86
X. CONCLUSIONES	88
XI. RECOMENDACIONES	89
XII. BIBLIOGRAFÍA	90
XIII. ANEXOS	94
13.1 EPIDEMIOLOGIA DE LA DIABETES	94
13.1.1 Datos mundiales	94
13.1.2 Datos en Colombia	94
13.1.3 Posibles causas epidemiológicas	95
13.2 GRANDES ESTUDIOS DE DIABETES EN LA POBLACIÓN HUMANA	95
13.2.1 <i>Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)</i>	95
13.2.2 <i>Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)</i>	96
13.2.3 <i>The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)</i>	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo general de la epigenética

Figura 2a. Estructura molecular de las modificaciones de bases del DNA.

Figura 2b. Representación esquemática de la transferencia del grupo metilo al carbono 5 de la citosina

Figura 3. Anatomía molecular de la cromatina, los sitios CpGs y el rol en la expresión génica

Figura 4. Representación esquemática de las estructuras de las *DNMT*'s.

Figura 5. Modelo clásico de la metilación

Figura 6. Diagrama de las posibles vías de desmetilación de DNA

Figura 7. Reprogramación en células germinales y preimplantación embrionaria en ratón

Figura 8. Tres rutas metabólicas que componen el ciclo de un carbono

Figura 9. Modelo que propone el rol de la epigenética en los mecanismos patogénicos de la diabetes

Figura 10. Mayores complicaciones de la diabetes

Figura 11. Genes asociados a variantes de T2DM

Figura 12. Vías de la patogénia de la T2DM y las complicaciones relacionadas

Figura 13. Cadena transportadora de electrones

Figura 14. Producción de superóxido por la cadena transportadora de electrones mitocondrial

Figura 15. Modelo general como la hiperglucemia induce daño tisular

Figura 16. La hiperglucemia incrementa el flujo de los polioles

Figura 17. Consecuencias patológicas por el incremento de AGEs

Figura 18. Consecuencia de la hiperglucemia por la activación de PKC

Figura 19. Incremento del flujo de las hexosaminas por la hiperglucemia

Figura 20. Sobreproducción de superóxidos mitocondriales activados por la hiperglucemia

Figura 21. Esquema de los mecanismos afectados por la hiperglucemia

Figura 22. Rol de la resistencia a la insulina y FFAs en la formación de ROS endotelial y aterogénesis macrovascular

Figura 23. Resumen esquemático de las vías que contribuyen a las complicaciones de la T2DM

Figura 24. Memoria metabólica y mecanismos epigenéticos en la complicación de la diabetes

Figura 25. Diagrama de flujo para el procedimientos de las ELISAs

Figura 26. Acción del SYBR Green

Figura 27: Diagrama de flujo metodológico del estudio molecular de pacientes del HFSF

Figura 28: Diagrama de flujo metodológico del estudio *in silico*

Figura 29. Porcentaje de la metilación en hidroximetilación global del DNA

Figura 30. Diferencias en la metilación e hidroximetilación global del DNA

Figura 31. Porcentaje de la metilación en hidroximetilación global del DNA, excluyendo datos de consumidores de alcohol y tabaco

Figura 32. Correlación de los porcentajes de metilación e hidroximetilación entre la edad (A y B) y tiempo de diagnóstico (C y D)

Figura 33. Expresión de genes *DNMT1* y *TET1* entre pacientes y controles.

Figura 34. Análisis de microarreglos de sangre periférica en pacientes T2DM y un grupo control

Figura 35. Análisis de la expresión diferencial de genes en sangre periférica de pacientes T2DM y el grupo control

Figura 36. Análisis de expresión en tejido pancreático entre pacientes T2DM y el grupo control

Figura 37. Análisis de expresión en tejido adiposo entre pacientes T2DM y el grupo control

Figura 38. Análisis de expresión en tejido muscular entre pacientes T2DM y el grupo control

Figura 39. Representación esquemática de las posibles vías de desmetilación del DNA.

Figura 40. DCCT y EDIC

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción génica de las *DNMTs*

Tabla 2. Descripción génica de las *TETs*

Tabla 3: Clasificación de las categorías principales de la Diabetes Mellitus

Tabla 4: Criterios para el diagnóstico de la Diabetes Mellitus

Tabla 5: Criterio para definir la población de alto riesgo de diabetes de la Asociación Americana de Diabetes

Tabla 6: Especies reactivas

Tabla 7. Buffer de lavado al 1X

Tabla 8. Preparación de la curva estándar de 5mC y 5hmC

Tabla 9. Dilución de anticuerpos, solución aumentadora y reveladora de fluorescencia

Tabla 10. Cebadores de control y amplificación

Tabla 11. Volumen de PCR convencional

Tabla 12. PCR convencional Go Taq Green

Tabla 13. Volúmenes para la síntesis de la primera cadena cDNA

Tabla 14. Segunda reacción para la síntesis del cDNA

Tabla 15. Condiciones de la síntesis de primera hebra en el termociclador

Tabla 16. Volúmenes para la PCR convencional

Tabla 17. Condiciones del control positivo para GAPDH

Tabla 18. Estandarización de concentraciones

Tabla 19. Condiciones de PCR cuantitativa

Tabla 20. Concentraciones óptimas de cebadores

Tabla 21. Volúmenes de la qPCR

Tabla 22. Condiciones de la PCR cuantitativa

Tabla 23: Tabla descriptiva de microarreglos

Tabla 24. Tabla característica de los grupos de análisis

Tabla 25. Rutas afectadas en tejido pancreático y sangre periférica

Tabla 26. Estimación de prevalencia de diabetes para el 2030.

Tabla 27. Resultados de la DCCT

Tabla 28. Resultados de EDIC

Tabla 29. Mayores descubrimientos por los estudios mundiales más importantes

SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

- *aa- aminoácido*
- *ADA- Asociación Americana de Diabetes*
- *ADCA-DN- Sordera-Ataxia Cerebelosa Autosómica Dominante y Narcolepsia*
- *ADP-ribosa- Dinucleótido de Adenina Cíclica unido a una ribosa*
- *AID/APOBEC- Deaminación de Citosina Inducida por Activación de la Apolipoproteína B*
- *AGA- Alteración de Glucemia en Ayuno*
- *AGEs- producto de Glicaciones Avanzadas*
- *BER- Sistemas de Reparación por Escisión de Base*
- *CA- Citosina-Adenina*
- *CAT- Catalasa*
- *CD- Deaminasa de Citosina*
- *cDNA- DNA complementario*
- *CGI- Islas CpGs*
- *CpGs- Dinucleótidos de Guaninas y Citosinas*
- *CVD- Enfermedad Cardiovascular*
- *CTE- Cadena Transportadora de Electrones*
- *DANE- Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas*
- *DAG- Diacylglycerol*
- *DCCT- Diabetes Control and Complication Trial*
- *DM- Diabetes Mellitus*
- *DNA- Ácido Desoxirribonucleico*
- *DNMTs- DNA Metiltransferasas*
- *DNMT1- DNA (citosa-5)- Metiltransferasa 1*
- *DNMT3A- DNA (citosa-5)- Metiltransferasa 3A*
- *DNMT3B- DNA (citosa-5)- Metiltransferasa 3B*
- *FSFB- Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá*
- *EDIC- Epidemiology of Diabetes Intervention and Complication*
- *EDTA- Ácido Etildiaminotetraacético*
- *eNOS- Oxido Nítrico Sintasa endotelial*
- *FADH₂- Dinucleótido de Flavina y Adenina*
- *FFA- Ácidos Grasos Libres*
- *GAD65- Autoanticuerpo de Ácido Glutámico*
- *GAPDH- Gliceraldehído- 3-fosfato Deshidrogenasa*
- *GDM- Diabetes Mellitus Gestacional*
- *GFAT- Fructose-6-fosfato Aminotransferasa*
- *GLUT's- Transportadores de Glucosa*
- *GSH-PX- Glutatión Peroxidasa*
- *HAT- Acetilasa de Histonas*
- *Hb- Hemoglobina*
- *HbA1c- Hemoglobina Glucosilada*
- *HDAC- Deacetilasas de Histonas*
- *HLA- Antígeno Leucocitario Humano*
- *hLP- Lactógeno Placentario Humano*
- *HMG-1- High-mobility group protein 1*
- *HMT- Metiltransferasa de Histonas*
- *HSN1E- Neuropatía Sensorial y Autosómica Hereditaria con Demencia y Pérdida de Audición tipo 1E*
- *IAs- Autoanticuerpo de Insulina*

- IA-2 y IA-2^a- *Autoanticuerpos de Fosfatasa de Tirosina*
- ICAs- *Autoanticuerpo de Isla Langerhans*
- IDF- *Federación Internacional de Diabetes*
- IFG- *Alteración de Glucosa en Ayuno*
- IGT- *Tolerancia Alterada de la Glucosa*
- IHC- *Intolerancia a los Hidratos de Carbono*
- IMF- *Intensidad de Fluorescencia Media*
- IR- *Resistencia a la Insulina*
- IR-S- *Receptores de Substrato de Insulina*
- IRCT- *Insuficiencia Renal Crónica Terminal*
- LADA- *Diabetes Autoinmune Latente del Adulto*
- LMRs- *Zonas Pobres en Metilación*
- MAT- *Metionina Adenosiltransferasa*
- MBDs- *Proteínas de Unión a Grupos Metilos*
- meDNA- *metilación en el DNA*
- MM- *Memoria Metabólica*
- MODY- *Diabetes tipo Mody ; Maturity Onset Diabetes of the Young*
- miRNAs- *MicroRNAs*
- MnSOD- *Manganeso Superóxidos Dismutasa*
- MS- *Metionina Sintasa*
- MTHRF- *Metiltetrahidrofolato Reductasa*
- mTHF- *metiltetrahidrofolato*
- NADPH- *Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato*
- NDRs- *Sitios Libres de Nucleosomas*
- NIDDK- *Instituto de Diabetes y Digestión y de Enfermedades del Riñón*
- NIH- *Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos*
- NFκB- *Factor Nuclear de Transcripción κB (Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de las Células B Activadas)*
- nt- *nucleótidos*
- qRT-PCR- *Reacción Cuantitativa en Tiempo Real de la Cadena de Polimerasa (PCR)*
- O₂- *Oxígeno molecular*
- OMS- *Organización Mundial de la Salud*
- ORF- *Marco de Abierto de Lectura*
- PARP- *Poly ADP-ribosa*
- P.b- *Pares de bases (p.b)*
- PCR- *Reacción en Cadena de Polimerasa*
- PKC- *Proteicinasas C*
- PTM- *Modificaciones Post-traduccionales de Histonas*
- RAGE- *Receptores de AGEs*
- REDOX- *Oxido-Reducción*
- ROS- *Especies Reactivas de Oxígeno*
- RNA- *Acido Ribonucleótido*
- RNS- *Especies Reactivas de Nitrógeno*
- SAM- *S-adenosilmetionina*
- SAT- *Tejido Adiposo Subcutáneo*
- Set7- *Metiltransferasa de Histonas*
- SAH- *S-adenosilhomocisteína*
- SMRT- *Single molecule real-time sequencing*

- SMUG1- *Glicosilasas de Cadena Sencilla que Remueven Uracilos*
- SOD- *Superóxidos Dismutasa*
- SUMO- *SUMOilación de Proteínas; Small Ubiquitin-Related Modifier*
- T1DM- *Diabetes Mellitus 1*
- T2DM- *Diabetes Mellitus 2*
- TET's- *Translocación Ten-Eleven*
- TET1- *Translocación Ten-Eleven-1*
- TET2- *Translocación Ten-Eleven-2*
- TET3- *Translocación Ten-Eleven-3*
- TCA- *Acido Tricarboxilico*
- TDG- *DNA Glicosilasa de Timina*
- TF- *Factores de Transcripción*
- TGF- *Factor de Crecimiento Transformante*
- THF- *Tetrahidrofolato*
- TSS- *Sitio de Inicio Transcripcional*
- TTS- *Sitio Final de Transcripción*
- UCP- *Proteínas Desacoplante (Termogenina)*
- UCP-1- *Termogenina-1*
- UDPGlcNAc- *UDP-acetilglucosamina*
- UKPDS- *The United Kingdom Prospective Diabetes Study*
- VCAM- *Molécula de adhesión en célula vascular*
- VEGF- *Factor de Crecimiento Vascular Endotelial*
- 5caC- *5-carboxicitosina*
- 5hmC- *5-hidroximetilcitosina*
- 5fC- *5-formilcitosina*
- 5mC- *5-metilcitosinas*

I. INTRODUCCIÓN

La epigenética es la ciencia que estudia los cambios heredables en la función de genes que no ocurren por causa de un cambio en la secuencia nucleotídica (Ling & Groop, 2009). Estas modificaciones epigenéticas pueden ser heredadas de una generación de células a otra como herencia mitótica y entre generaciones de una especie como herencia meiótica. Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios aún existe poca información sobre la herencia de rasgos epigenéticos entre generaciones. Hoy en día se sabe que la epigenética puede ser afectada por el ambiente, generando alteración en los patrones como se ha visto en las enfermedades multifactoriales complejas como la diabetes (Ling & Groop, 2009).

Los mecanismos epigenéticos incluyen modificaciones covalentes del DNA, modificación covalente de las colas de histonas, remodelación no covalente de la cromatina y regulación génica por RNAs no codificantes (Gluckman et al., 2011). A través de todos estos mecanismos, la epigenética influye en procesos fundamentales de la célula como el silenciamiento transcripcional de genes, la inactivación del cromosoma X, la impronta genómica, la regulación de elementos móviles transponibles, el establecimiento y mantenimiento de la identidad celular y la regulación de la estabilidad cromosómica y genómica (Bhutani, Burns, & Blau, 2011; Jaenisch & Bird, 2003; Laurent et al., 2010)

La metilación del DNA es el mecanismo mejor estudiado y se ha considerado parte integral de las decisiones fundamentales de las células, jugando un papel fundamental en el desarrollo de los organismos (Bhutani et al., 2011). En los vertebrados, la metilación del DNA se da por un proceso catalítico enzimático en la posición del carbono 5 de la citosina, principalmente en dinucleótidos CpGs. Las DNA metiltransferasas (DNMTs) son las enzimas responsables de realizar la acción combinada de establecer y mantener los patrones de metilación en el DNA (Patel et al. 2013; Chen et al. 2013).

Diversos estudios han demostrado que estas DNMTs son altamente expresadas en el desarrollo celular y menos expresadas en células diferenciadas (Jones & Liang 2009). Los nuevos patrones de metilación son establecidos por las DNMT3a y DNMT3b, en el proceso conocido como metilación *de novo*. Por su parte, las DNMT1 son las enzimas responsables del mantenimiento de esos patrones tras las divisiones celulares, usando para ello las hebras hemimetiladas como molde. Nuevos estudios sobre las DNMT1 han descrito su importancia en el desarrollo embrionario y en cáncer, siendo primordiales para el mantenimiento de la identidad celular (Bhutani et al., 2011).

Estudios recientes han evidenciado que las citosinas de los mamíferos pueden también ser hidroxiladas. Esta marca se ha visto expresada abundantemente en tejido cerebral y células pluripotentes. La función y la distribución del DNA hidroximetilado aún no está clara. Sin embargo, hoy en día, la hidroxilación de las 5mC, se ha postulado como el principal y único mecanismo de desmetilación del DNA basado en un proceso enzimático, frente al mecanismo más clásico basado en la falta de mantenimiento por las DNMT1. El objetivo principal de este trabajo es determinar si existe otra posible vía que esté alterando la oxidación de los grupos metilos y que permita entender los mecanismos de desmetilación en condiciones patológicas, como en la diabetes.

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica asociada a factores genéticos y ambientales (Villeneuve, Reddy, & Natarajan, 2011). Su origen multifactorial y heterogéneo se caracteriza por una desregulación homeostática de la glucosa y se correlaciona con el estilo de vida, una alimentación hipercalórica, sedentarismo y obesidad (Online ADA, 2015). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la diabetes afecta aproximadamente a 346 millones de personas a nivel mundial y que este número aumentará para el 2030 a 400 millones. Es considerada una epidemia y un problema de salud pública que resulta en la disminución de la expectativa de vida dada sus complicaciones (Intine & Sarra, 2012; Online ADA, 2015).

Más allá de las causas de la enfermedad, el estrés oxidativo, asociado a la elevada producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno, juega un papel fundamental en el desarrollo de las complicaciones

típicas tanto microvasculares y macrovasculares asociadas a la diabetes (Giacco & Brownlee, 2010). Si bien, hasta ahora nunca se ha asociado esta desregulación oxidativa con procesos epigenéticos, la evidencia ha demostrado la existencia de hipometilación del DNA en las células afectadas por las complicaciones diabéticas y paralelamente se ha establecido la importancia de un buen control glucémico para prevenir la severidad de las complicaciones durante la vida del paciente (Villeneuve et al., 2011).

Hoy en día se ha descrito el desarrollo de numerosas enfermedades asociadas a alteraciones de patrones de metilación. Los estudios del epigenoma en trastornos metabólicos, cáncer, Alzheimer y obesidad han sido los más estudiados, aunque no se tiene mucha información al respecto. En este proyecto utilizamos la diabetes como modelo biológico para relacionar el efecto de los estados hiperglucémicos y la desmetilación del DNA. Es por ello nuestro interés en estudiar los mecanismos de desmetilación e hidroximetilación del DNA por procesos oxidativos asociados a hiperglucemia mal controlada en pacientes diabéticos. Este proceso supondría la existencia de una vía alternativa de desmetilación que explicaría las hipometilaciones encontradas en muchas enfermedades complejas, no sólo la diabetes sino también las enfermedades que presentan como elementos comunes oxidación celular, inflamación y muerte por distintas vías.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los patrones de metilación del DNA en células somáticas son generalmente estables y heredables. En células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, el proceso de la metilación y desmetilación del DNA ocurre principalmente de manera activa para establecer patrones de metilación específicos que luego le darán la característica de una célula somática diferenciada. Una de las grandes preguntas en la epigenética es cómo se generan estos patrones de metilación y desmetilación en el DNA durante el desarrollo de un organismo y cómo éstos se mantienen en células ya diferenciadas (Rodríguez-Dorantes, Téllez-Ascencio, Cerbón, Lez, & Cervantes, 2004).

Estudios realizados en células humanas, ratas y peces cebra han documentado que los estados de hiperglucemia inducen la desmetilación de citosinas del genoma, generando cambios permanentes que afectan la memoria metabólica (Dhliwayo, Sarras, Luczkowski, Mason, & Intine, 2014), e inducen la aparición de enfermedades como la Diabetes Mellitus. La DM es un trastorno metabólico que se caracteriza por la deficiencia en la producción de insulina, la resistencia a su acción o ambas. Como consecuencia genera un estado de hiperglucemia persistente y altos niveles de oxidación celular que conllevan al daño en el tejido endotelial por la incapacidad de regular la entrada de glucosa. Esto a su vez causa las complicaciones microvasculares y macrovasculares que afectan de manera crónica y progresiva a órganos diana.

Sin embargo, aún no es claro cómo la hiperglucemia puede afectar varios tejidos y cómo ésta genera el efecto acumulativo que explica la memoria metabólica. A este respecto, la epigenética puede ser de ayuda para entender este tipo de cambios acumulativos. Por esta razón, este proyecto busca analizar los mecanismos moleculares que generan cambios en la metilación del DNA bajo condiciones de hiperglucemia. Este proyecto propone como hipótesis general de trabajo una nueva vía de desmetilación del DNA basada en la oxidación directa de las metilcitosinas desencadenada por las especies reactivas de oxígeno.

III. JUSTIFICACIÓN

Desde que iniciaron los estudios bioquímicos, moleculares y genéticos de la diabetes se fueron conociendo las múltiples dimensiones y la heterogeneidad de dicho desorden, del cual aún no se entiende por completo su patogenia. A pesar del conocimiento que existe sobre las complicaciones de la diabetes, de su efecto en el metabolismo de la glucosa y en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), no está claro cómo estos mecanismos pueden influir en la memoria metabólica y en las alteraciones epigenéticas de la enfermedad generando una memoria metabólica.

La función de la metilación del DNA en diversos contextos se conoce desde los años setenta, sin embargo poco se sabe de las dinámicas que subyacen a los cambios epigenéticos, como en el caso de los promotores génicos. Si por un lado la metilación tiene una función clara en el silenciamiento génico y en la estabilidad del genoma, está claro que la falta de metilos también tendría su propia importancia. Hoy en día se ha caracterizado muy bien la vía de metilación basado en DNMTs, pero poco se sabe sobre los mecanismos de la desmetilación. Recientemente se han propuesto dos modelos de desmetilación basados en una vía activa y otra pasiva, aun así estos modelos no logran explicar las distintas situaciones fisiológicas de la desmetilación celular y las situaciones en condiciones patológicas. En la actualidad se ha observado hipometilación global generalizada en patologías como diabetes, cáncer, enfermedades autoinmunes, inmunológicas, neurológicas entre otras.

En este proyecto se ha utilizado la Diabetes Mellitus como modelo biológico experimental para estudiar y cuantificar los mecanismos de metilación e hidroximetilación en un estudio de casos y controles de pacientes con diabetes y sujetos sanos, con el objetivo de determinar la asociación de los estados de hiperglucemia con los cambios en los patrones de metilación. Se correlacionaron los resultados clínicos y moleculares con el fin de generar una hipótesis alternativa referente al estilo de vida y así identificar la posible vía afectada.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios en los niveles de metilación e hidroximetilación del DNA en sangre periférica, asociarlos con el control glucémico de pacientes diabéticos y comprobar *in silico* las alteraciones moleculares que expliquen los cambios epigenéticos en Diabetes Mellitus.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles de metilación e hidroximetilación global del DNA en sangre periférica de pacientes diabéticos frente a controles sanos.
2. Correlacionar las alteraciones en los niveles de metilación o hidroximetilación de los pacientes diabéticos con su control glucémico.
3. Demostrar la falta de desregulación de DNMT1 y TET1 entre pacientes diabéticos y por lo tanto su independencia del proceso de desregulación epigenética.
4. Analizar el efecto de la diabetes en diferentes tejidos afectados y los genes implicados a través del estudio de microarreglos de metilación y expresión *in silico*.

V. MARCO TEÓRICO

5.1 EPIGENÉTICA

5.1.1 Historia de la epigenética

La historia de la epigenética está ligada al estudio de la evolución y el desarrollo de los organismos. Hasta la década de los 50 la palabra epigenética se utilizó para clasificar los eventos del desarrollo embrionario. Seguido esto, hubo grandes debates entre embriólogos sobre la naturaleza y los mecanismos responsables del desarrollo de los organismos. Dos escuelas con pensamientos distintos se formaron intentando explicar la epigenética. Unos pensaban que cada célula contenía elementos preformados responsables en llevar a cabo el desarrollo, corriente conocida como el “preformacionismo” y los que pensaban que el desarrollo se daba por reacciones químicas de componentes solubles que ejecutaban el desarrollo, también conocida como la “epigénesis” (Felsenfeld, 2014).

El embriólogo Conrad Hal Waddington, estableció en la década de los 40 que la epigenética es la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre genes y su producto, generando un fenotipo determinante (Goldberg, Allis, & Bernstein, 2007). Fue reconocido por establecer el paisaje epigenético para ilustrar y clasificar todos los eventos del desarrollo de un organismo, desde la fertilización del cigoto y los procesos reguladores que parten del material genético hasta el desarrollo de una célula (Felsenfeld, 2014).

5.1.2 Concepto de epigenética

En 1975 se publicaron dos artículos distintos con resultados similares por los autores Arthur D. Riggs y Robin Holliday & Frank Pugh. Ambos proponen que la metilación del DNA puede actuar como una marca epigenética que tiene un fuerte efecto en la expresión génica y que los cambios de la metilación del DNA explican la activación o inactivación de la expresión durante el desarrollo. A su vez establecieron que distintas enzimas eran las responsables de la metilación (Felsenfeld, 2014). Esta fue la primera vez que se le dio una función a ciertas marcas covalentes que ya se conocían, como la metilación, pero que hasta ese momento no se sabía para que se utilizaban.

Hoy en día la epigenética es descrita como la ciencia que estudia los patrones de expresión génica heredables y cambios en el fenotipo que no se deben a la alteración en la secuencia del DNA. En otras palabras, estudia los cambios en el DNA que no afectan la secuencia nucleotídica de un gen pero producen cambios en su expresión. Se sabe que los cambios epigenéticos son heredables y se mantienen durante la meiosis. Esta ciencia se basa en el estudio de las uniones de grupos químicos al DNA y a las histonas que intervienen en la elección del destino celular, desarrollo embrionario y estabilidad genómica (Holliday, 2006).

5.1.3 Los cuatro pilares de la epigenética

Diversas señales epigenéticas participan en la expresión diferencial específica de cada célula incluyendo las modificaciones covalentes del DNA, las modificaciones post-traduccionales de colas de histonas (i.e., acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones y ubiquitinaciones, entre otras.), la incorporación de variantes de histonas, la regulación de la cromatina y la regulación por RNAs no codificantes (Maresca, 2015). La figura a continuación ilustra los niveles de los mecanismos epigenéticos.

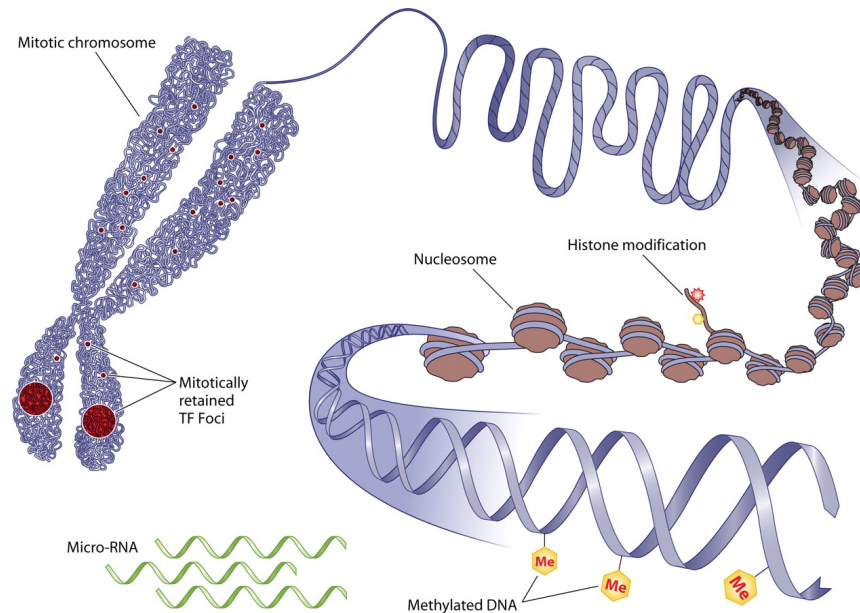


Figura 1. Modelo general de la regulación epigenética (Zaidi et al, 2010).

5.1.3.1 Remodelación de cromatina

La remodelación de la cromatina es un mecanismo importante ya que afecta a todos los estados de la transcripción. Se caracteriza por la remodelación transitoria y la apertura de la cadena de DNA de su octámero de histonas para formar un *loop* de DNA y así mover los nucleosomas a una posición translacional, todo para dar accesibilidad a los factores de transcripción (TFs). Los nucleosomas están compuestos de 147pb dando 1.65 vueltas alrededor de un octámero de histonas con 14 puntos de unión al DNA. Esta interacción múltiple hace de los nucleosomas uno de los complejos protéicos más estables bajo condiciones fisiológicas normales. La forma en que está compactada la cromatina, le provee propiedades dinámicas que son reguladas por varios grupos protéicos (Li, Carey, & Workman, 2007).

Los complejos remodeladores de la cromatina son complejos protéicos capaces de mover los nucleosomas de su posición para dejar expuesta la región promotora y permitir la entrada de complejos transcripcionales para que se dé la expresión génica. Esta actividad está mediada por complejos con actividad ATPasa en este caso particular, por el complejo SWI/SNF que fue el primer complejo identificado en levaduras. Su función es la de desestabilizar el nucleosoma al romper el contacto del DNA con el octámero de histonas y así poder moverse libremente para asociarse a la región de interés. Todos los complejos remodeladores de nucleosomas pertenecen a la familia SNF2 de ATPasas y se dividen en 7 subgrupos dependiendo de sus dominios

5.1.3.2 Modificación de las colas de histonas

La modificación de las colas de histonas es un mecanismo importante en la modificación post-traducciona de las histonas. Estas modificaciones incluyen metilación de los residuos arginina (R) y lisina (K), acetilación en lisinas, ubiquitinación, ADP-ribosilación, sumoilación de lisinas y fosforilación de serinas y treoninas. Muchas de estas marcas son señales que dirigen la remodelación hacia un estado concreto. Algunas modificaciones están asociadas a actividad transcripcional, como la acetilación de la histona 3 e histona 4 (H3 y H4) o la di- o tri-metilación (me) de H3K4. Estas son conocidas como modificaciones de eucromatina. Otras modificaciones están relacionadas a la inactivación de genes o regiones, como la H3K9me y la H3K27m y, se conocen como modificaciones heterocromáticas. Sin embargo, muchas de ellas

no influyen en la transcripción, pero si en la estabilidad del genoma, o en reparación, como puede ser la fosforilación de la variante H2AX o la H3K79me (Li et al., 2007).

5.1.3.3 RNAs no codificantes

Los RNAs no codificantes conforman una extensa familia de moléculas que intervienen en distintos procesos. Según su extensión se dividen en RNAs cortos no codificantes y RNAs largos no codificantes. Durante la última década han sido muy estudiados, en especial los miRNAs, siendo los más conocidos hoy en día y de los que se tiene mayor información. Los microRNAs son secuencias cortas de RNAs no codificantes de aproximadamente 20-24 nucleótidos (nt) que están ampliamente involucrados en la regulación de la expresión de genes en organismos multicelulares, afectando así la estabilidad, la transcripción y la traducción de los mRNAs. Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II generando un transcrito primario con su Cap y su cola poliadenilada (pri-miRNAs). Este transcrito primario es cortado por la ribonucleasa Drosha III para generar un transcrito de 70nt (pre-miRNA), que luego es cortado en el citoplasma por la ribonucleasa Dicer para generar un miRNA maduro y un miRNA antisentido (miRNA*). El miRNA maduro se incorpora en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y reconoce por emparejamiento de bases a sus mensajeros de RNA diana, generando inhibición en la traducción y la desestabilización del mRNA (NBI, miRNA, 2016).

Dentro del tema de estudio de esta tesis, cabe destacar un miRNA en particular, miRNA133a. Estudios en células del miocardio (cardiomiocitos) han descrito la forma como dicho miRNA133a regula negativamente la actividad de DNMT1 y por lo tanto, su desregulación estaría afectando a la metilación de mantenimiento (NBI, miRNA, 2016).

5.1.3.4 Modificación covalente del DNA

Gracias a los estudios SMRT (*Single molecule real-time sequencing*) en el cual se detectan las posibles modificaciones en las bases del DNA, se ha establecido que existen varias representaciones que son ilustradas en la siguiente figura.

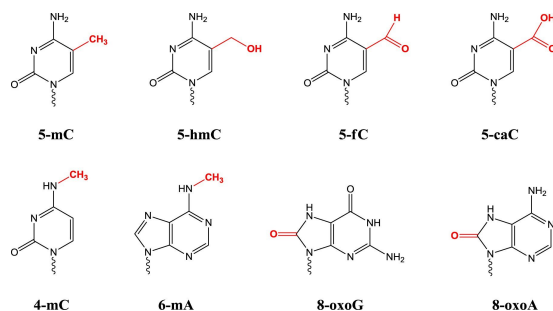


Figura 2a. Estructura molecular de las modificaciones de bases del DNA.

Entre las modificaciones del DNA, la metilación es la más conocida y estudiada. En los mamíferos, la metilación del DNA ocurre principalmente por la modificación covalente en los dinucleótidos CpG y es catalizado por enzimas que transfieren el grupo metilo. Esta modificación no cambia la secuencia de nucleótidos y actúa como un regulador crítico del genoma (C. C. Chen et al., 2013; Maresca, 2015; Zaidi et al., 2010).

Aunque la metilación de los residuos de citosina en el DNA se conoce desde los años 50, no fue hasta 1975 cuando se describió su función sobre el genoma, asociándola desde entonces de forma insoluble al silenciamiento génico. Se describió como una marca que podía ocurrir *de novo* y ser heredada mitóticamente en células somáticas a partir del reconocimiento enzimático de secuencias CpG palindrómicas hemimetiladas, así mismo podía ser interpretada por proteínas de unión al DNA para su

silenciamiento. Evidencias recientes sugieren que esta marca desempeña otras funciones en el genoma ya que se encuentra distribuida a lo largo de todo el genoma y no exclusivamente en regiones CpG cercanas al sitio de inicio de transcripción como se creía (Jones, 2012). La siguiente figura representa la transferencia del grupo metilo con S-adenosilmetionina (SAM) como donador del mismo.

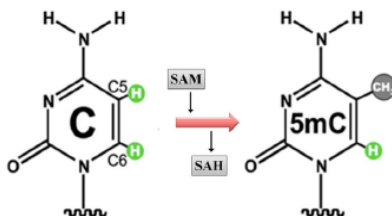


Figura 2b. Representación esquemática de la transferencia del grupo metilo al carbono 5 de la citosina (Maresca, 2015)

Esta modificación de la citosina es un regulador epigenético crítico en el desarrollo de los mamíferos pues juega un papel importante en la diferenciación y desarrollo celular, así como en las enfermedades. La correcta metilación del genoma es fundamental en el mantenimiento de la identidad celular, la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica. Igualmente protege la integridad genómica por el silenciamiento de transposones y otros elementos móviles (Denis et al., 2011; Laurent et al., 2010; Bhutani, Burns, & Blau, 2011; Chen & Rigs, 2011). La metilación también juega un papel importante en el silenciamiento transcripcional de genes durante la formación de la heterocromatina, ya sea por la interferencia de la unión de los factores de transcripción a su sitio diana o afectando las modificaciones en las colas de histonas y la ocupación de nucleosomas dentro de las regiones promotores de genes, afectando así la estructura de la cromatina. Algunas metilaciones son reversibles debido a que las células pueden eliminar fracciones de metilos de las islas CpGs a través de las replications (Zaidi et al., 2010).

La metilación es importante para establecer las características fenotípicas de las células, tejidos y organismos. Poco se sabe de su variación natural en los humanos y cómo esto influye en las diferencias fenotípicas entre individuos, así como en la susceptibilidad a ciertas enfermedades y sus patologías, respuesta a medicamentos y agentes ambientales (Heyn et al., 2013; Horvath, 2013). En estudios de cáncer, se ha demostrado que la generación de patrones aberrantes de hipermetilación conducen a cambios en la estructura de la cromatina y al silenciamiento de genes supresores de tumores (Zaidi et al., 2010; Laurent et al., 2010; Jones, 2012).

Como modificación epigenética, la metilación puede ser heredada a través de múltiples divisiones celulares. Los patrones de metilación genómicos son establecidos durante dos períodos del desarrollo, en células germinales y en la preimplantación embrionaria, generando células con un amplio potencial de desarrollo (Branco, Ficz, & Reik, 2011; Denis et al., 2011; Volkmar, Dedeurwaerder, Cunha, Ndlovu, Defrance, Deplus, Calonne, Volkmar, Igoillo-Esteve, et al., 2012).

5.1.3.4 .1 El papel de las CpGs y la metilación del DNA

Por muchos años se ha establecido que la metilación del DNA en mamíferos ocurre simétricamente en los residuos de citosina en ambas hebras de dinucleótidos de CpG, pero estudios recientes han demostrado que esta marca no sólo se limita a las secuencias CpGs. En estudios *in vitro*, se ha observado que la metilación también ocurre de forma no simétrica, como por ejemplo en nucleótidos CpXpG. (Denis et al., 2011).

La distribución de las CpGs en el genoma es heterogénea. Algunas áreas son ricas y otras pobres en dinucleótidos CpG. Los niveles y patrones de metilación son tejido específico y no todas las citosinas están metiladas. Esto último es lo que diferencia los estados de actividad génica entre células diferenciadas, ya que inducen procesos fisiológicos claves del desarrollo. (El-Osta et al., 2008; Jones, 2012). En el genoma humano hay 56 millones de sitios CpG, de los cuales el 70-80% están metilados y corresponden al 4-6% de todas las citosinas. Los dinucleótidos de CpGs están concentrados en las pequeñas regiones llamadas islas CpGs (CGIs) que conforman el 70% de los promotores de genes humanos (Laurent et al., 2010; Saxonov, Berg, & Brutlag, 2006). El 60% de los genes tienen CGIs en sus promotores y tienen sitios libres de nucleosomas (NDRs) en el sitio de inicio de la transcripción (TSS). En el resto del genoma de los mamíferos las islas CpGs están pobremente representadas, este fenómeno está muy posiblemente asociado a la alta mutagénesis de la 5-metilcitosina en comparación con la citosina no metilada (Jin, Kadam, & Pfeifer, 2010).

En células somáticas la gran mayoría de CGIs se mantienen desmetiladas en sus TSS, son marcadas por la trimetilación en la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) y se caracterizan por la remodelación nucleosomal con la histona H2A.Z, un antagonico de las DNMTs, asociada a la transcripción. Generalmente, las zonas corriente abajo de los TSS son pobres en CGIs, aunque son ricas en dinucleótidos CpGs. Estos últimos pueden estar o no metilados y se ha visto su función en el control de splicing. Los niveles de expresión son controlados por factores transcripcionales pertenecientes a las proteínas polycomb, trayendo nucleosomas al TSS marcados con la H3K27me3. Sin embargo, se ha observado que la metilación de novo ocurre en ausencia de H3K4me2 y H3K4me3 (Jones, 2012). En la siguiente figura se puede observar la anatomía molecular de los CpGs.

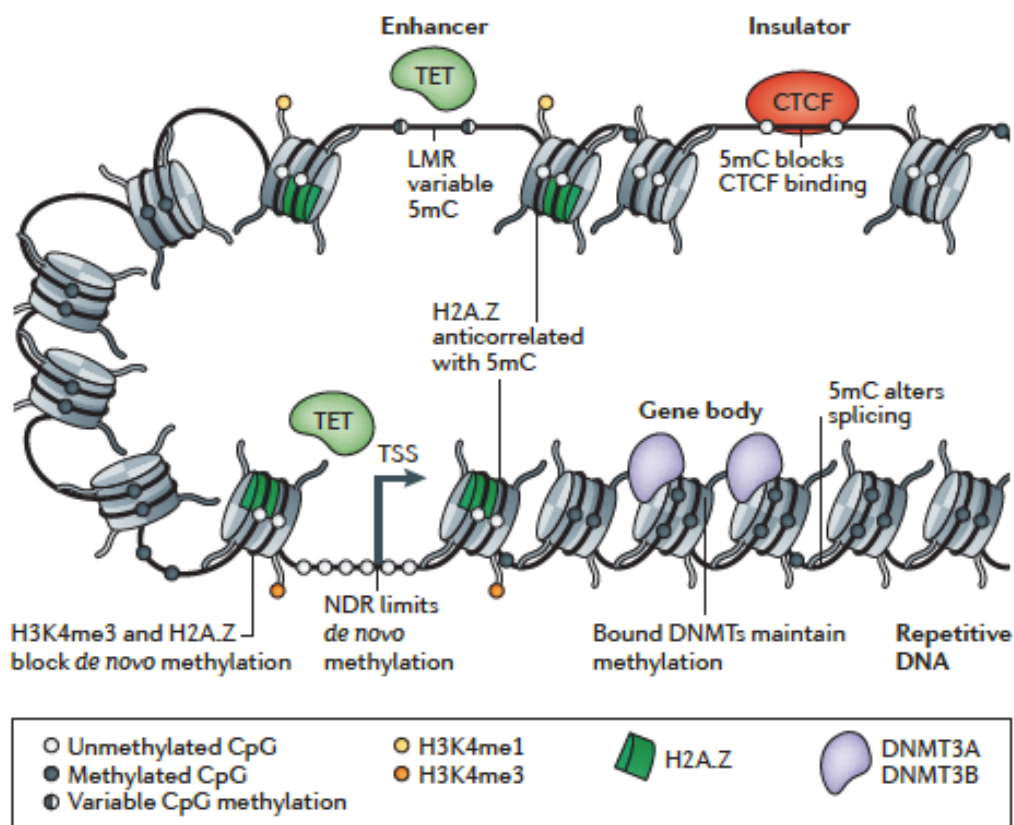


Figura 3. Anatomía molecular de la cromatina, los sitios CpGs y el rol en la expresión génica (Jones, 2012).

Los genes con sitios TSS pobres de CGIs generalmente están no metilados y son altamente expresivos, tal y como ocurre en células primordiales. Hoy en día se sabe que la metilación no sólo se limita al silenciamiento génico o a la expresión del gen. Diversos estudios han evidenciado que existe una correlación inversa entre la densidad de las islas CpGs y los estados de metilación en promotores. Los genes activos usualmente están hipometilados en sitios de inicio transcripcional (TSS) y altos niveles de metilación se encuentran en los cuerpos génicos para bloquear la iniciación de transcripciones aberrantes dentro de genes, previniendo así la producción de microRNAs (mRNAs) y proteínas truncadas. Los sitios de corte y empalme son regiones caracterizadas por un cambio en la metilación del DNA, teniendo mayor metilación los exones que los intrones, sugiriendo así la implicación en los procesos de corte, empalme y protección. (Chatterjee & Vinson, 2013; Laurent et al., 2010; Heyn et al., 2013).

La mayoría de los cuerpos génicos son pobres en CpGs aunque generalmente están extensamente metilados. Metilaciones en CpGs de exones son la principal causa de mutaciones transicionales C→T, que conllevan a enfermedades de las líneas celulares germinales y al cáncer. Sin embargo, la metilación en cuerpos génicos no se asocia a represión y más bien actúa como una protección de la transcripción de elementos móviles como LINEs, Alu, entre otros. Se ha visto que están más metilados los exones en comparación a los intrones, posiblemente como se mencionó previamente, para la regulación correcta en el proceso de *splicing* (Jones, 2012).

Los promotores *downstream* son ricos en CpGs a diferencia de los promotores alternativos que generalmente son pobre en CpGs. La metilación en sitios enhancer es pobre en CpGs dado que son sitios importantes para la unión de complejos transcripcionales y es por esto que contienen zonas pobres en metilación (LMRs). En el caso de los *insulators*, proteínas que se han descrito por bloquear la interacción de los sitios enhancer y el promotor, se evita la transcripción mediante la proteína CTCF, que se une en ausencia de metilación y es por esto que esta marca es importante para la actividad de dicha proteína (Jones, 2012).

5.1.3.4 .2 Enzimas encargadas de la metilación del DNA

A. DNA metiltransferasas

En el genoma de los mamíferos, las DNA metiltransferasas (DNMTs) son pieza clave en la regulación epigenética. Las DNMTs catalizan la transferencia del grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) obtenido en el ciclo de un carbono a la citosina del DNA. (Chen & Riggs, 2011; Goll & Bestor, 2005. Estas enzimas son las encargadas de establecer y mantener la metilación en la citosina de los CpGs del DNA. Existen tres enzimas funcionales como son las DNMT1, DNMT3a, y DNMT3b. Otra enzima como es la DNMT3L tiene funciones reguladoras, pero carece de sitio catalítico. Por último, existe también la DNMT2, que en la actualidad se considera que ejerce su función casi exclusivamente sobre el RNA (Figura 4). Todas son esenciales para establecer los patrones de metilación y para mantenerlos tras los procesos de replicación (Denis et al., 2011). A continuación se muestran las características génicas de las *DNMTs* (Tabla 1).

	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT3a</i>	<i>DNMT3b</i>
Posición cromosómica	19p13.2	2p23.3	20q11.21
Transcrito primario (pb)	5408	9501	4336
Transcrito codificante (pb)	4851	2739	2562
Proteína (aa)	1616	912	853
Fenotipo asociado a su	Ataxia cerebreal, sordera, narcolepsia	Síndrome Tatton-	Síndrome de inmunodeficiencia,

disfunción.	autosómica dominante, neuropatía tipo IE hereditaria	Brown	inestabilidad de la región centromérica y anomalías faciales
-------------	---	-------	--

Tabla 1. Descripción génica de las *DNMTs*. (OMIM, CCDS, NCBI)

Por muchos años se ha propuesto que el modelo de metilación se basa en dos funciones, *de novo* y de mantenimiento. Las enzimas DNMT3a y DNMT3b son las encargadas de establecer patrones nuevos de metilación. Están altamente expresadas en el desarrollo y la diferenciación celular y pobremente expresadas en las células diferenciadas. A pesar de su baja expresión en células somáticas, hoy en día se ha descrito que son necesarias para mantener los patrones de metilación junto a la DNMT1. (Illingworth & Bird, 2009; Rönn et al., 2013)

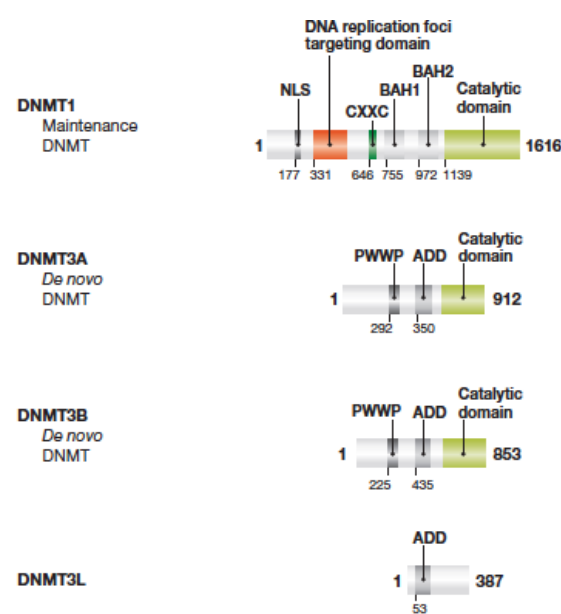


Figura 4. Representación esquemática de las estructuras de las *DNMT's* (Denis et al., 2011).

El mantenimiento de los patrones de metilación se establece por el reconocimiento de la hebra hemimetilada durante la replicación del DNA, por medio de las DNMT1. Estudios genómicos en el mantenimiento de estos patrones han descrito la necesidad de más interacciones proteícas. El mantenimiento de la metilación no es tan sencillo como parece y no sólo está involucrada la DNMT1, ya que el desarrollo y el control de los sistemas de replicación debe garantizar que se mantenga la fidelidad de dichos patrones. Estudios demuestran que las DNMT3a y DNMT3b son necesarias para mantener los patrones de metilación juntos a las DNMT1 y que el fiel mantenimiento de los patrones no sólo se mantiene por una fiel copia durante la embriogénesis, sino también por la ayuda en la metilación por parte de éstas DNMTs (El-Osta et al., 2008; Rönn et al., 2013). En la figura 5 se observa el modelo clásico de la metilación.

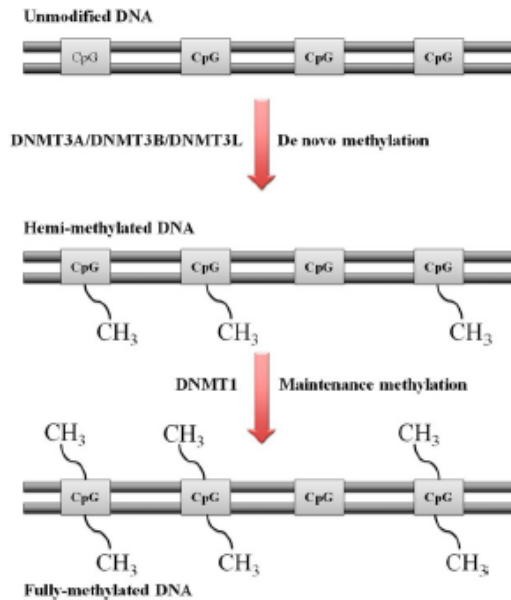


Figura 5. Modelo clásico de la metilación (Maresca, 2015).

a DNMT1: DNA (citosina-5-)-metiltransferasa 1

La DNMT1 es la principal enzima para preservar el mantenimiento de los patrones de metilación de las células tras la replicación. Existen dos características importantes, su expresión es ubicua y alta durante la proliferación y varía según el estado del ciclo celular de manera dependiente, siendo mayor en la fase S de síntesis. La otra característica es su escasez en las células que no están en división. En casos patológicos como el cáncer, se ha descrito actividad de metilación *de novo* por estas enzimas (Denis et al., 2011; Maresca, 2015) (Chen and Li 2006). Otros estudios han demostrado la capacidad de reparar lesiones causadas en el DNA (Mortusewicz, Schermelleh, Walter, Cardoso, & Leonhardt, 2005).

En humanos, esta enzima se conforma de 1616 aminoácidos y es la más abundante en preservar y propagar la existencia de estos patrones. La DNMT1 muestra preferencia por regiones hemimetiladas y ha mostrado ser una enzima altamente procesiva, capaz de metilar largos tramos de la cadena sin disociarse de ella (Herman et al 2004; (Denis et al., 2011; Reiling et al., 2010). Además interactúa con el factor PCN de la DNA polimerasa que asegura su localización en la horquilla de replicación (Jones, 2012).

Los estudios *knockdown* de DNMT1 muestran extensiva desmetilación del DNA y letalidad embrionaria durante la gastrulación. Células embrionarias con ausencia de DNMT1 son viables dado la poca necesidad de la enzima, pero mueren después de inducir la diferenciación. (Chen et al 2013; Maresca, 2015). Mutaciones que afectan el gen *DNMT1*, se han asociado a dos enfermedades neurodegenerativas autosómicas dominantes: neuropatía sensorial y autonómica hereditaria con demencia y pérdida de audición tipo 1E (HSN1E) y sordera- ataxia cerebelosa autosómica dominante y narcolepsia (ADCA-DN). Una característica importante de la DNMT1 es su dependencia por el dominio SRA de la UHRF1 para su reclutamiento en los sitios CG (Bashir Aamir et al., 2012).

B. UHRF1 (Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains)

El gen UHRF1 codifica para una proteína perteneciente a la familia de RING-finger tipo E3 de la ligasa de ubiquitina y se caracteriza por la unión de una secuencia específica en el DNA para el reclutamiento de la DNMT1. Dicha unión media la regulación de la estructura de la cromatina y la expresión del gen diana. La UHRF1 ayuda a la DNMT1 a reconocer la hebra hemimetilada (Branco et al., 2011; Z. Chen & Riggs, 2011).

5.1.4 Desmetilación activa y pasiva

Existen dos mecanismos principales de desmetilación, la demetilación pasiva y la desmetilación activa. La desmetilación pasiva ocurre por la reducción o ausencia en la actividad de las DNMTs, en especial de la DNMT1, en el mantenimiento de la 5mC tras la replicación celular, perdiéndose así la metilación en la hebra hemimetilada. La desmetilación activa, por su parte, ocurre en respuesta a cambios de señales en la célula. Se basa en dos vías principales, una vía oxidativa que hasta el momento se cree que es generada por las glicosilasas ten-eleven translocasas (TET's) que oxidan el grupo metilo de la 5-metilcitosina (5mC) a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) y otra vía de deaminación de citosina inducida por la activación de la apolipoproteína B (AID/APOBEC) que por los mecanismos de reparación celular se desmetilan de forma activa las 5-metilcitosinas generando así una citosina (Bhutani et al., 2011).

El papel de la desmetilación ha sido ampliamente documentado en procesos celulares importantes como en el desarrollo temprano, la reprogramación durante la gametogénesis y en la clonación. Igualmente se ha descrito su importancia en la formación de la memoria y la neurogénesis, en las respuestas inmunes por medio de las citoquinas y en la tumorigénesis. En diversas situaciones están involucradas estas modificaciones que afectan la forma en la cual se van a expresar o no los genes (Zhu, 2009).

5.1.4.1 Maquinaria de desmetilación activa

La maquinaria de la desmetilación activa está representada por dioxigenasas y desaminasas que se ven representadas en la figura 6. La vía de la oxidación de la 5mC por las TETs, genera un compuesto intermediario 5hmC que puede ser oxidado por la misma enzima y así formar otros intermediarios como 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxicitosina (5caC). Aún no se ha demostrado si la 5caC puede ser descarboxilada por las DNA glicosilasas de timina (TDG), pero se ha demostrado que a partir del 5fC, las TDG remueven el grupo timina para formar una citosina. La vía de la deaminación es descrita como otra vía activa en la cual participan complejos moleculares, entre ellas, la apolipoproteína B (AID/APOBEC), la TDG, las proteínas de unión a grupos metilos (MBD4) y las glicosilasas de cadena sencilla que remueven uracilos (SMUG1), que por mecanismos de reparación por escisión de bases (BER) producen una baseapurínica que es reparada por la base correcta. Hoy en día, dichos mecanismos siguen en estudio (Branco et al., 2011).

Diversos estudios han propuesto que el proceso de desmetilación es bidireccional. Esto ha sido observado en estudios de reprogramación celular y en la acción de reguladores asociados a la plasticidad y destino celular (Bhutani et al., 2011). Un estudio reciente, reveló una característica nueva de las DNMTs en vertebrados, la capacidad de convertir el 5mC a 5hmC en presencia de iones de calcio y la ausencia de agentes reductores (Chen et al., 2013).

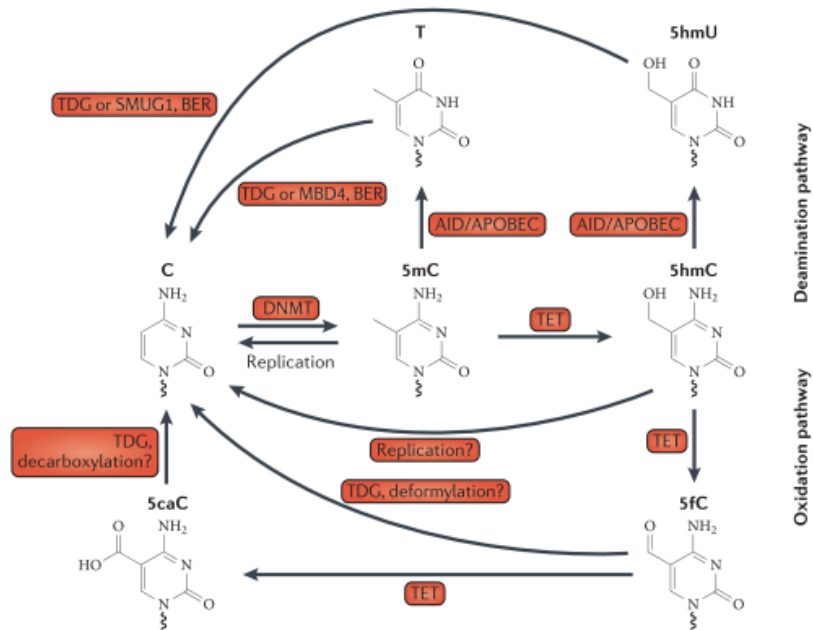


Figura 6. Diagrama de las posibles vías de desmetilación de DNA (Branco et al., 2011).

A. *Ten-eleven translocasas (TETs)*

La existencia de la 5hmC fue reportada en los 50 por Wyatt, aunque su función es conocida hasta hace muy poco tiempo. El descubrimiento de las glicosilasas TET1, TET2 y TET3 fue de gran interés por su capacidad de catalizar la conversión del 5mC a 5hmC en diversos tipos de cáncer. Con el tiempo, se describió su función de activar la represión de promotores en genes inactivos. En estudios en ratones se identificó su actividad en el mantenimiento de la pluripotencia y en la desmetilación en el desarrollo temprano (Figura 7) y fue así como se conoció que TET3 está involucrada en la pérdida rápida de metilación en el pronúcleo masculino durante la formación del cigoto después de la división celular (Bhutani et al, 2011).

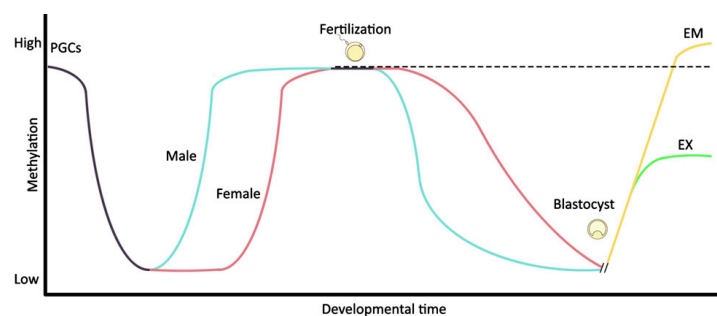


Figura 7. Reprogramación en células germinales y preimplantación embrionaria en ratón. Durante los estadios iniciales del desarrollo, las células PGCs se encuentran altamente metiladas y entran en desmetilación durante la pro-espermatogénesis y la pro-ovogénesis, para finalmente restablecerse. En el caso del genoma paterno (azul) después de la fertilización ocurre inmediatamente una desmetilación. En el genoma materno (rojo), la desmetilación se da luego de pocas divisiones celulares. Ambos genomas son remetilados durante la implantación embrionaria (Ding & Huang, 2014).

Todas las enzimas *TETs* tiene un dominio CD (rico en citosinas y regiones DSBH (Dominio con actividad dioxigenasa de metilcitosina de unión a metal)), que en presencia del ácido α -cetoglutarico y hierro descarboxilan el O_2 para generar 5hmC a parti del 5mC. Los genes *TET1* y *TET3* contienen dominios CXXC importantes para la unión a los dinucleótidos CpG, mientras que le gen *TET2* carece de este dominio (He et al., 2011). A continuación se muestran las características génicas de las *TETs* (Tabla 2).

	<i>TET1</i>	<i>TET2</i>	<i>TET3</i>
Posición cromosómica	10q21	4q24	2p13.1
Transcrito primario (pb)	9288	10166	11388
Transcrito codificante (pb)	6411	3498	5388
Proteína (aa)	2136	1165	1795
Fenotipo	Leucemia aguda	Trombocitopenia esencial, policitemia vera y leucemias.	Problemas en desarrollo celular

Tabla 2. Descripción génica de las *TETs*. (OMIM, CCDS, NCBI)

b. *TET1*

La *TET1* está altamente expresada en células embrionarias (ES) y está pobremente regulada durante la diferenciación. Su dominio CXXC es característico y hace parte del grupo de proteínas que lo utilizan para la unión al DNA, en este caso se une a citosinas metiladas e hidroximetiladas. (Xu et al., 2011). Estudios basados en inmunoprecipitación de anticuerpos 5hmC en DNA hidroximetilado (hMeDIP), revelaron un alto contenido de 5hmC en cuerpos génicos, especialmente en intrones y exones, y bajo contenido en promotores. También se confirmó la alta densidad de 5hmC en sitios de terminación de la transcripción (TTS) y presencia de *TET1* como regulador de la transcripción (Xu et al., 2011)

B. AID/APOBEC

La desmetilación mediada por glicosilasas ha sido muy estudiada en plantas. En humanos se cree que por lo menos está involucrada en un paso de la desmetilación. La deaminasa de citidina (*AID*) junto a complejos protéicos contribuye a la remoción extensa de metilación del DNA en células germinales primordiales de humanos y en el núcleo paterno del cigoto (Sanz, Kota, & Feil, 2010). Aunque aún faltan estudios para determinar su verdadera función en la desmetilación.

El complejo *AID/APOBEC* (apoliproteína B) comparte la misma característica de contener un motivo de zinc en su sitio catalítico. Existen diferentes variantes de esta enzima y se ha visto en diversos tejidos que la presencia de ella conlleva a procesos de desmetilación por la vía de reparación por escisión de bases BER (Ramiro & Barreto, 2015).

C. TDG

La *TDG* es una glicosilasa de timina que se caracteriza por remover los motivos de timina de mismatch de G/T, C/T y T/T por la hidrólisis de la unión del carbón-nitrógeno entre el azúcar-fosfato del esqueleto del DNA. También es capaz de remover uracilos y 5-bromouracilos de guaninas mal apareadas. Esta enzima juega un papel fundamental en la defensa celular contra mutaciones causadas por la deaminación espontánea de la 5-metilcitosina y la citosina (NCBI, 2016).

D. MBD4

La proteína de unión a grupo metilo (MBD) se caracteriza por tener un dominio de unión a metilos en el N-terminal y un dominio con actividad glicosilasa en el C-terminal, importante en la reparación de DNA (NCBI, 2016).

5.1.5 Ciclo de un carbono, clave en la metilación

El metabolismo bioquímico de un carbono es clave para el proceso de metilación del DNA. La S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilhomocisteína (SAH) son sustratos y productos esenciales para la metilación. Su tasa se ha utilizado como indicador de la capacidad de metilación celular estableciendo que una disminución de SAM disminuye a su vez la metilación (Caudill et al., 2001).

El ciclo de un carbono recibe este nombre porque transporta un carbono durante su reacción y está conformado por tres ciclos bioquímicos que participan conjuntamente. La transmetilación, conocido como el ciclo de SAM, es importante por aportar el grupo metilo a la DNMT1. El segundo es el ciclo del folato, fundamental para la síntesis de poliaminas donde el folato es el compuesto donador del grupo metilo. Finalmente, el ciclo de la transulfuración, que es esencial e importante para la generación de precursores de glutatión y taurina. Evidencias genéticas recientes sugieren que la hiperactivación de esta vía conduce a la oncogénesis y establece estados epigenéticos alterados (Locasale, 2013).

La metionina-sintasa (MS) junto al cofactor vitamínico B12, son importantes en la reacción para generar metionina. A partir de este compuesto junto el adenosil trifosfato (ATP), la MAT cataliza la reacción para generar SAM, compuesto principal que dona su grupo metilo a las DNMT's para producir S-adenosilhomocisteína y entrar al ciclo de transulfuración o remetilarse. En la siguiente imagen se observan los tres ciclos involucrados en el transporte del grupo metilo.

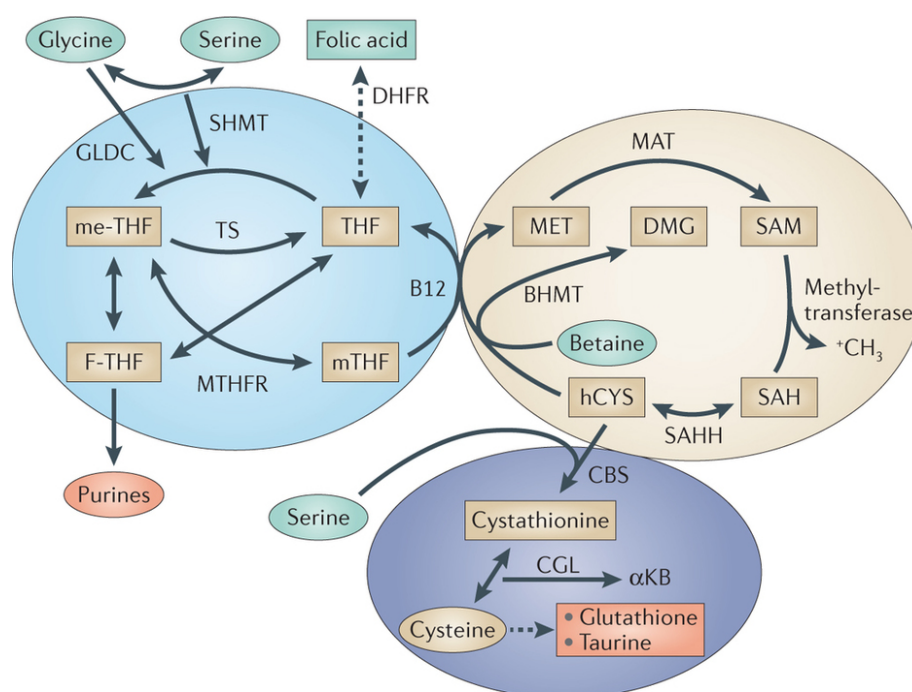


Figura 8. Tres rutas metabólicas que componen el ciclo de un carbono (Locasale, 2013).

5.2 DIABETES MELLITUS COMO MODELO BIOLÓGICO

5.2.1 Concepto actual de la diabetes mellitus

La diabetes se caracteriza por una deficiencia del páncreas en producir suficiente insulina, la disminución de la respuesta de los tejidos para utilizarla, o ambas. La resistencia a la insulina es el resultado de una pobre respuesta tisular a la insulina aún en presencia de concentraciones normales de la hormona. En la diabetes se altera el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (ADA & IDF, 2016; Anexos 1.)

La diabetes es una de las enfermedades crónicas más comunes en el mundo entero (Matough, Budin, Hamid, Alwahaibi, & Mohamed, 2012). La diabetes causa un desorden metabólico caracterizado por hiperglucemia crónica generando así diversas complicaciones. Su incidencia se ha visto en aumento en los últimos 10 años y se cree que se duplicará para el 2030 (Forbes & Cooper, 2013). Se considera un problema de salud pública grave y creciente a nivel mundial ya que provoca una reducción en la expectativa de vida y un aumento en la morbilidad debido a las complicaciones específicas que genera la enfermedad (Ceriello, 2008; Intine et al., 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes. Más del 80% de las muertes se registran en países de bajos y medianos recursos económicos. Se calcula que para el 2030, la diabetes será la séptima causa de mortalidad con más de 400 millones de afectados (Online OMS, 2015; Villeneuve et al. 2011). Según la Federación Internacional de Diabetes, más de la mitad de los posibles casos aún no han sido identificados (Online IDF, 2015). En América Latina la DM Tipo 2 es el tipo más común y la incidencia va en aumento con tasas dos veces más altas comparada con otros sitios distintos (Online IDF, 2014).

En Colombia, su incidencia anual va en aumento y su prevalencia oscila entre el 4 - 8% en zonas urbanas y el 2% en zonas rurales. Múltiples factores genéticos y ambientales como el cambio en los estilos de vida, el envejecimiento, el mestizaje y la urbanización han impulsado el aumento de sobrepeso y el síndrome metabólico contribuyendo así a su patogenicidad y persistencia. En el 2007 el Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE, 2016), informó que la diabetes se encuentra dentro de las primeras cinco causas de muerte anuales y es cuatro veces más frecuente en la población urbana que en la rural. La prevalencia de DM Tipo 1 es del 0.07% y su incidencia es de 3 a 4 por 100,000 niños menores de 15 años (Aschner, 2010).

5.2.2 Causas de la diabetes

La diabetes tiene un origen multifactorial en el que participan factores genéticos y factores medioambientales. El estilo de vida occidental, caracterizado por un desbalance de micronutrientes y dietas con alto valor energético promueven el desarrollo de obesidad y diabetes tipo 2. Se suma a esto la inactividad física y el aumento considerable del peso. Todos estos factores son consecuencia de acontecimientos como la migración de poblaciones rurales a zonas urbanas, cambios de alimentos naturales a alimentos procesados ricos en energía, exposición a agentes contaminantes orgánicos y sintéticos, el desequilibrio temprano en la microbiota, el uso indebido de antibióticos y el desarrollo tecnológico que reduce el gasto energético para realizar un esfuerzo. Todos estos factores contribuyen al sedentarismo y al sobrepeso, promoviendo el desarrollo de diabetes en personas susceptibles (Nolan, Damm, & Prentki, 2011), como se resume en la siguiente imagen.

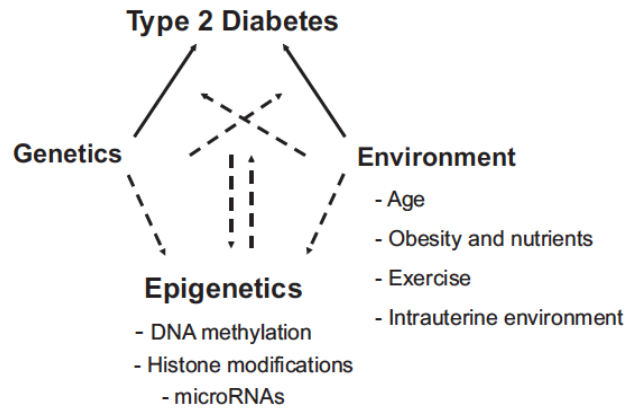
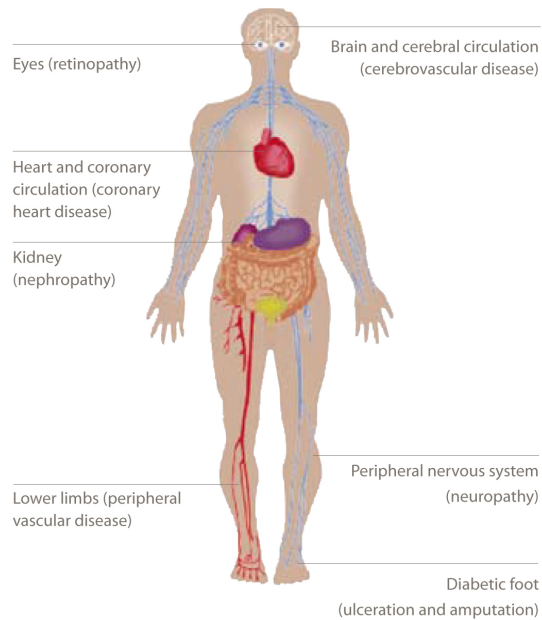


Figura 9. Modelo que propone el rol de la epigenética en los mecanismos patogénicos de la diabetes (Ling & Groop, 2009)

5.2.3 Mayores complicaciones en la diabetes

Las mayores complicaciones de la diabetes se asocian a daños microvascular y macrovasculares, generados por una elevación crónica de los niveles de azúcar en sangre (Figura 10). Entre las complicaciones microvasculares se describen la retinopatía diabética con pérdida potencial de la visión, la nefropatía diabética que produce daño renal y las neuropatía diabética que ocasiona daño directo en los nervios y alteración de los vasos que nutren a los nervios; *vasa nervorum*. Las complicaciones macrovasculares por su parte, afectan principalmente la arteria coronaria e incluyen enfermedades arterioescleróticas cardiovasculares prematuras, enfermedades cerebrovasculares y enfermedad arterial periférica con alto riesgo de ulceraciones y amputaciones de las extremidades (Brownlee, 2005; Forbes & Cooper, 2013; Giacco & Brownlee, 2010; Poretsky, 2010). En la siguiente figura se visualizan las complicaciones de la diabetes.

THE MAJOR DIABETIC COMPLICATIONS



Source: *Diabetes Atlas* 3rd Ed., © International Diabetes Federation, 2006

Figura 10. Mayores complicaciones de la diabetes (Online IDF, 2016). Complicaciones microvasculares: retinopatía diabética, enfermedad coronaria, nefropatía diabética y enfermedad periférica vascular. Complicaciones macrovasculares: neuropatía diabética, pie diabético y enfermedad cerebrovascular.

Actualmente, la DM es la primera causa de insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) en el mundo. Se estima que el 50% de los casos son causa de nefropatías diabéticas. Es la primera causa de ceguera adquirida en el mundo y la primera causa de amputaciones no debidas a traumas. La DM es uno de los cuatro factores de riesgo clásico para aterosclerosis y enfermedades coronarias. Los otros tres corresponden al tabaquismo, la hipertensión y la dislipidemia. Es importante anotar que el 80% de los diabéticos fallecen a causa de las complicaciones de la aterosclerosis por infartos al miocardio, eventos cerebrovasculares o enfermedad arterial periférica (Poretsky, 2010). Aunque la diabetes es una enfermedad común en la mayoría de países, su patogenia aún no es clara debido a las múltiples interacciones de factores genéticos y ambientales (Online IDF, 2016).

5.2.4 Clasificación de la diabetes

Esta enfermedad compleja y heterogénea contiene diversos mecanismos etiológicos. Su clasificación es arbitraria y está descrita en 4 categorías principalmente: DM tipo 1 (T1DM), DM tipo 2 (T2DM), DM gestacional (GDM) y DM causada por condiciones genéticas específicas (Tabla 3) (Poretsky, 2010; OMS, 2016). Este último grupo es poco común y se caracteriza por desórdenes endocrinos, defectos en el páncreas exocrino, endocrinopatías, defectos en la función de células β , defectos genéticos en el procesamiento de la insulina o su acción, por infecciones o drogas. Las más conocidas en esta categoría son la DM tipo MODY, (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) y la DM Autoinmune Latente del Adulto (tipo LADA) que aparece en la juventud y en la edad adulta (Poretsky 2010).

CATEGORIAS PRINCIPALES	
I. DIABETES TIPO 1	<ul style="list-style-type: none"> • Autoinmune • Idiopática
II. DIABETES TIPO 2	<ul style="list-style-type: none"> • Insulinorresistencia y defectos e la secreción de insulina • Defectos en la secreción de insulina con o sin resistencia a la insulina
III. OTROS TIPOS ESPECÍFICOS	<ul style="list-style-type: none"> • Defectos genéticos de la función de las células beta • Defectos genéticos en la acción de la insulina • Enfermedades del páncreas exocrino • Endocrinopatías • Inducidas por fármacos o químicos • Asociada a infecciones • Formas poco comunes de Diabetes mediada por inmunidad • Otros síndromes genéticos a veces asociados con Diabetes
IV. DIABETES GESTACIONAL	

Tabla 3. Clasificación de las categorías principales de la Diabetes Mellitus (OMS, 2016).

C. Diabetes Mellitus tipo 1

Se conoce que la T1DM se genera por una respuesta directa o indirecta del sistema inmune en la destrucción de las células β del páncreas, productoras de insulina. Por muchos años se consideró que los afectados eran niños y adolescentes, pero esto ha cambiado en la última década. Hoy en día la edad de inicio de síntomas ya no es un factor restrictivo. La T1DM se caracteriza y diagnostica por un trío clásico de polidipsia, polifagia y poliuria junto a estados hiperglucémicos. Aunque aparece en edades tempranas también puede darse en adultos. En estos casos, se debe hacer reemplazo de terapia hormonal de inmediato por la cual se requiere de mayor intervención en los tratamientos (Atkinson, Eisenbarth, & Michels, 2014).

La mayoría de estudios en la diabetes tipo 1 han reportado que la enfermedad se debe a una destrucción autoinmune de las células β productoras de insulina en el páncreas o a la incapacidad de regeneración de células β (Atkinson et al., 2014). Por esta razón, los paciente T1DM son insulino dependientes.

D. Diabetes Mellitus tipo 2

La T2DM es un trastorno metabólico de la energía de la homeostasis. Se caracteriza por hiperglucemia y alteración en el metabolismo de los lípidos causados por las células β de los islotes, incapaces de secretar adecuada insulina en respuesta a diversos grados de sobrealimentación, inactividad como consecuencia de sobrepeso, obesidad y resistencia a la insulina. Hoy en día es un problema grave a nivel mundial debido al rápido aumento de su prevalencia (Nolan et al., 2011). El devastador daño a los órganos afecta el sistema de salud generando costos alarmantes.

Se conocen cuatro condiciones fisiopatológicas que desencadenan la T2DM; la obesidad, la resistencia a la insulina en músculo y tejido adiposo, la disfunción en la secreción de insulina por células beta y el aumento en la producción de insulina hepática Su patofisiología se debe a un exceso crónico de la energía por nutrientes, que se desarrolla en personas genética y epigenéticamente susceptibles, afectando así las vías neurohormonales. Individuos resistentes a la insulina son capaces de resistir a la sobrecarga crónica de nutrientes debido a un islote robusto de células β , manteniendo la secreción adecuada de insulina para la

compensación según lo requerido y la expansión saludable del tejido adiposo subcutáneo (SAT). En pocas palabras el cuerpo es capaz de dispersar el exceso de calorías a la grasa subcutánea en lugar de almacenarla. De esta manera se mantienen los niveles de nutrientes en la sangre además de otros tejidos como el hígado, músculo esquelético, corazón y ovarios (Nolan et al., 2011).

En cambio, los individuos susceptibles desarrollan diabetes por la falla de estos mecanismos adaptativos en respuesta al exceso de energía (Figura 11). Las células β fracasan por el exceso de trabajo en la producción de insulina y son incapaces de compensar dicho exceso energético. Se genera un estrés celular causado por un desbordamiento de nutrientes a tejido no adiposo, esto a su vez aumenta la secreción endógena de glucagón y genera incapacidad de almacenar energía en el tejido subcutáneo. Resultando así en la inflamación de los tejidos, incremento de glucógeno hepático y resistencia a la insulina. La disminución en la función de las células β puede terminar en su destrucción y la necesidad de administrar insulina (Nolan et al., 2011).

Un estudio de detoxificación de nutrientes reveló el mecanismo como las células β pancreáticas pueden desregularse como medida preventiva de intoxicación. Describen como éstas censan los niveles de nutrientes en sangre y modulado por señales neurohormonales, inducen la secreción de insulina de acuerdo a las necesidades del organismo. Esto genera una activación metabólica en los individuos susceptibles a diabetes en quienes las células β reducen su potencial como medida preventiva para evitar la intoxicación por nutrientes, generando como resultado una falla en los islotes (Nolan et al., 2011). En la figura 12 se observa la diferencia de susceptibilidades genóticas entre las personas que desarrollan la enfermedad frente a las que no.

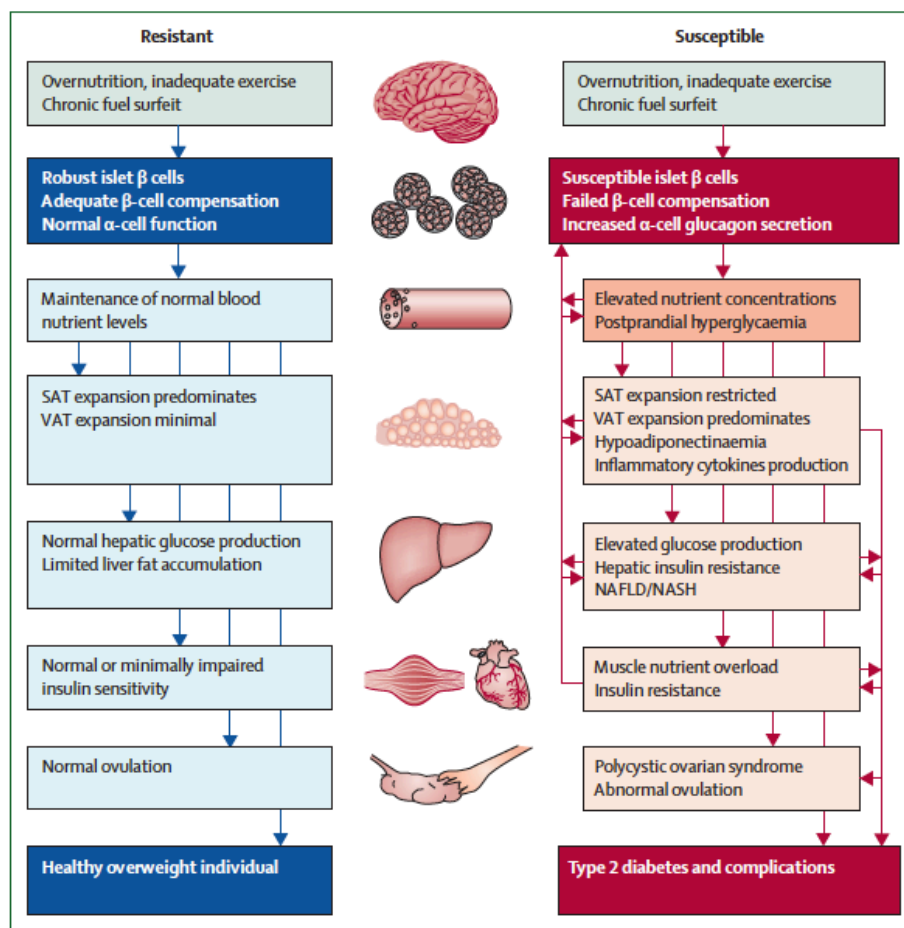


Figura 11. Vías de la patología de la T2DM y las complicaciones relacionadas. (Nolan et al., 2011).

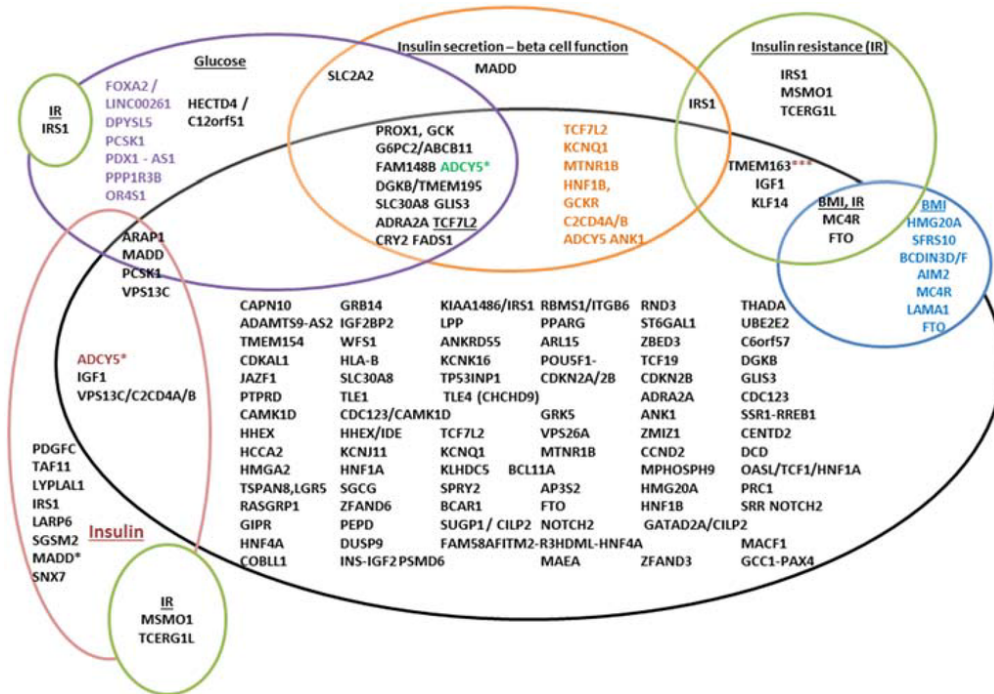


Figura 12. Genes asociados a variantes de T2DM (Prasad & Groop, 2015).

5.2.5 Criterios de Diagnóstico

El diagnóstico de la diabetes se puede realizar con base en la medición de glucemia en ayunas como muestra la tabla 4. La medición de la glucemia característica para diagnosticar la diabetes es que la glucemia esté por encima de ≥ 200 mg/dl a cualquier hora del día y ≥ 126 mg/dl en ayunas. Existen otras clasificaciones según la intolerancia a la glucosa sin embargo, ésta es la más utilizada.

Medición de la glucemia causal a cualquier hora del día	≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l)
Glucemia en basal en ayuno de 8-14 horas	≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l)
Prueba de tolerancia a la Glucosa en ayunas y a 2 horas de Poscarga	≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) 75g de glucosa oral

Tabla 4. Criterios para el diagnóstico de la Diabetes Mellitus (Poretsky 2010).

	Diabetes (WHO and ADA)*	IFG and IGT (WHO)*	Prediabetes (ADA)*	GDM† and ODP‡ (IADPSG)
HbA _{1c} (%)	$\geq 6.5\%$	NA	$\geq 5.7\%$ and $< 6.5\%$	ODP, $\geq 6.5\%$
Fasting plasma glucose (mmol/L)	≥ 7.0	IFG ≥ 6.1 and < 7.0	≥ 5.6 and < 7.0	GDM, ≥ 5.1 , ODP ≥ 7.0
75 g OGTT post-load plasma glucose (mmol/L)	2 h, ≥ 11.1	IGT 2 h, ≥ 7.8 and < 11.1	2 h, ≥ 7.8 and < 11.1	GDM, 1 h ≥ 10.1 2 h, ≥ 8.5
Random glucose (mmol/L)	≥ 11.1 with classic symptoms	NA	NA	ODP, ≥ 11.1

ADA=American Diabetes Association. IFG=impaired fasting glucose. IGT=impaired glucose tolerance. GDM=gestational diabetes mellitus. ODP=overt diabetes in pregnancy. IADPSG=International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups. HbA_{1c}=glycated haemoglobin A_{1c}. NA=not applicable. OGTT=oral glucose tolerance testing. *While WHO and ADA diagnostic criteria for diabetes are identical, the approaches to assessment of intermediate hyperglycaemia or prediabetes differ. **Fasting blood sugar of ≥ 5.1 mmol/L and < 7.0 mmol/L at any time of pregnancy is diagnostic of GDM. The usual time of OGTT in pregnancy for GDM is 24–28 weeks' gestation. †Screening for ODP by measurement of HbA_{1c}, fasting plasma glucose, or random blood glucose concentration is recommended for the first antenatal visit. Elevated random plasma glucose values need to be confirmed. ‡In the absence of unequivocal hyperglycaemia, results should be confirmed with retesting.

Table 2: Diagnostic criteria for diabetes, IFG, IGT, prediabetes, and gestational diabetes

Tabla 5. Criterio de diagnóstico para los diferentes tipos de Diabetes Mellitus (Nolan et al., 2011).

5.3 OXIDACIÓN CELULAR RELACIONADA A LA DIABETES

5.3.1 Rol del estrés oxidativo

El rol del estrés oxidativo en las complicaciones de las enfermedades metabólicas ha sido de gran interés a nivel científico y público. Diversos estudios clínicos y experimentales han reportado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis y el desarrollo de las complicaciones de ambos tipos de diabetes. Sin embargo, el mecanismo por el cual el estrés oxidativo puede contribuir y acelerar el desarrollo de las complicaciones de la diabetes aún no es claro. Se sabe que la hiperglucemia induce la formación de radicales libres, afectando así el sistema de defensa antioxidante endógeno y las vías enzimáticas y no enzimáticas que contrarrestan las especies reactivas de oxígeno (Matough et al., 2013).

5.3.2 Especies reactivas de oxígeno

Existen dos principales familias de especies reactivas; las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se forman a partir de la reducción del oxígeno molecular (O_2) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que son producidas por la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) (Matough et al., 2013).

Las ROS son especies altamente reactivas (Tabla 6), de tiempo de vida media muy corto y se producen en el metabolismo normal del oxígeno, en todos los sistemas biológicos aerobios. Estas reaccionan con todas las moléculas a su alrededor, especialmente con las que se encuentran cerca de su sitio de formación. Su reactividad es dada al apareamiento de su última capa de valencia, pasando de un estado de inestabilidad a uno de equilibrio. Sabemos que el O_2 que utilizamos para respirar proviene de manera exógena como producto de la oxidación del agua que se realiza en los fotosistemas II de las plantas. Por medio de la respiración y la alimentación, reducimos el O_2 en agua para formar energía en ATP (Luna López, 2010). Contradictoriamente de la importancia fundamental del oxígeno molecular para sostener la vida, se sabe que el oxígeno es también tóxico a través de la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Matough et al., 2013).

Reactive Oxygen Species	
RADICALS	NONRADICALS
Superoxide, $O_2^{\cdot-}$	Hydrogen peroxide, H_2O_2
Hydroxyl, OH^{\cdot}	Hypochlorous acid, $HOCl$
Peroxyl, ROO^{\cdot}	Ozone, O_3
Alloxyl, RO^{\cdot}	Singlet oxygen, 1O_2
Hydroperoxyl, HO_2	Peroxynitrite, $ONOO^-$
Reactive Nitrogen Species	
Nitric oxide, (nitrogen mono) NO^{\cdot}	Peroxynitrite, $ONOO^-$
Nitrogen dioxide, NO_2^{\cdot}	Alkyl peroxynitrites, $ROONO$
	Dinitrogen trioxide, N_2O_3
	Dinitrogen tetroxide, N_2O_4
	Nitrous acid, HNO_2
	Nitronium anion, NO^+
	Nitroxyl anion, $NO^{\cdot-}$
	Nitrosylation, NO^+
	Nitryl chloride, NO_2Cl
Reactive Chlorine Species	
Atomic chlorine, Cl^{\cdot}	Hypochlorous acid, $HOCl$
	Chlorine, Cl_2
	Nitronium (nitryl) Chloride, NO_2Cl

Tabla 6. Especies reactivas (Matough et al., 2013).

Como se ha visto en diversos estudios, la formación de ROS y RNS causa daño en macromoléculas biológicas como las del plasma y células endoteliales. Igualmente son importantes en la señalización y

defensa del organismo, en la fagocitosis y en la función de los neutrófilos, macrófagos y células del sistema inmune. A su vez participan como mediadores de cascadas de señalización intracelular (Matough et al., 2013).

5.3.3 Cadena transportadora de electrones y la formación de ROS

La cadena de transporte de electrones es la principal generadora de ROS intracelular. Se compone de cuatro complejos protéicos I, II, III, y IV; NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, citocromo bc1, y citocromo c oxidasa respectivamente, como se puede apreciar en la figura 12.

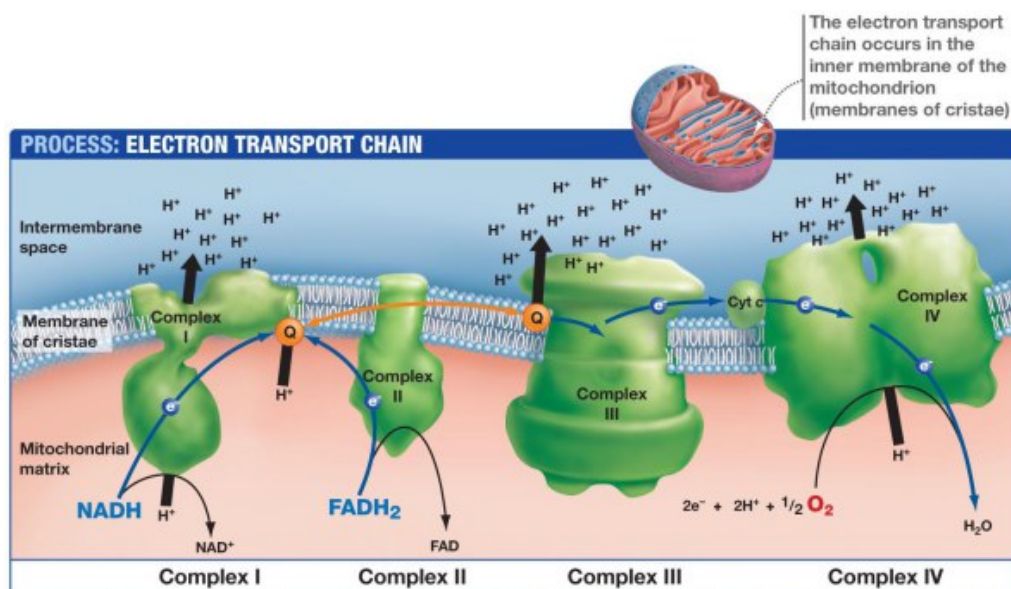


Figura 13. Cadena transportadora de electrones. Se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y su función es oxidar NADH y FADH₂ y bombear H⁺ al compartimiento externo de la mitocondria. La fosforilación oxidativa produce 32 ATP's (2013, García. Disponible online)

Esta cadena está organizada para regular la formación de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP) y para bombear protones a través de los complejos I, III y IV, creando así un voltaje mitocondrial. Este voltaje permite la entrada de proteínas desacopladoras (UCP) a la mitocondria para generar calor y mantener constante la generación de ATP (Brownlee, 2005).

En el metabolismo normal, la glucosa entra al ciclo de Krebs para ser metabolizada y generar un dinucleótido de nicotinamida (NADH), compuesto que dona los electrones al complejo I de la cadena. El otro compuesto donador de la cadena es el dinucleotido de flavina y adenina (FADH₂), coenzima que le aporta el electrón a la succinato deshidrogenasa, complejo II. Ambos electrones son transferidos a la coenzima Q y esta los transfiere al complejo III, el citocromo c y complejo IV que finalmente se une a un oxígeno molecular y es reducido a agua (Brownlee, 2005).

5.3.4 Aumento de oxidación en caso de hiperglucemia

La generación de superóxido por mitocondrias disfuncionales se ha postulado como el proceso principal del desarrollo de las complicaciones de la diabetes. Más del 90% del oxígeno en los humanos es metabolizado durante la fosforilación oxidativa, en la cual la glucosa y otros metabolitos donan sus electrones para reducir el oxígeno molecular para la generación de ATP. A pesar de ser un proceso altamente regulado, entre el 1 al 3% de este oxígeno es parcialmente reducido a O₂⁻ en lugar de ser parte de la generación de agua útil para las enzimas antioxidantes (Forbes & Cooner, 2013; Brownlee, 2005).

En la diabetes, la hiperglucemia induce la superproducción de superóxidos mitocondriales como resultado del exceso de glucosa que debe ser metabolizada. Cuando la cadena transportadora alcanza su umbral de transporte de electrones, el complejo III se bloquea, causando que los electrones retrocedan a la coenzima Q y esta termine donando el electrón a un oxígeno molecular, generando superóxidos. La isoforma mitocondrial de la superóxido dismutasa convierte el superóxido a peróxido de hidrogeno que luego es convertido a otras moléculas reactivas por diversas enzimas (Brownlee, 2005). Estudios *in vitro* han sugerido hipótesis de cómo la súper producción de O_2^- y el colapso del potencial de membrana generan la fuga de electrones en lugar de generar ATP (Copper & Forbes, 2013). La siguiente imagen representa la fosforilación oxidativa.

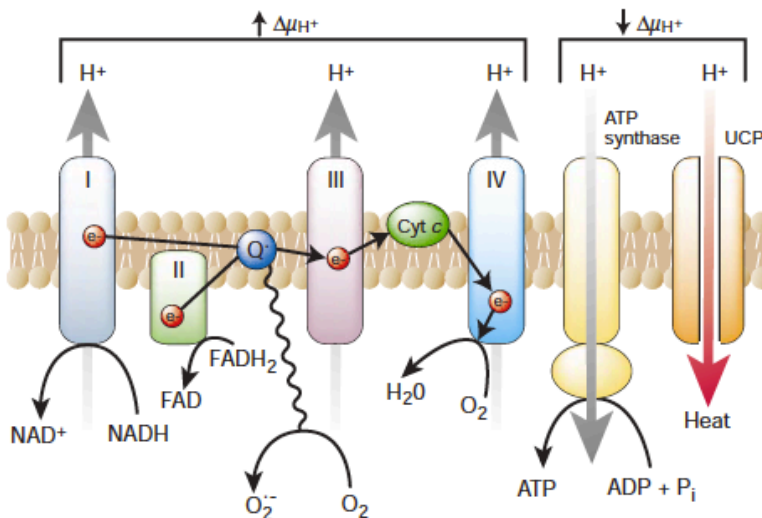


Figura 14. Producción de superóxido por la cadena transportadora de electrones mitocondrial. El incremento de los donadores de electrones ($NADH$ y $FADH_2$) por los estados de hiperglucemia derivados del ciclo de Krebs generan un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\mu_{H^+}$) mediante bombeo de protones por la membrana interna mitocondrial. Inhiben así el transporte de electrones al complejo III, aumentando la vida media del producto intermediario coenzima Q, reduciendo O_2 a superóxido (Giacco & Brownlee, 2013).

5.3.5 Complicaciones de la diabetes por baja regulación oxido reducción y la supervivencia celular

El balance entre la tasa de generación de radicales libres y su eliminación es muy importante pues su acumulación es perjudicial. La etiología del estrés oxidativo en la diabetes surge de una variedad de mecanismos tales como la excesiva producción de radicales libres por la auto-oxidación de la glucosa, glicación de proteínas y la glicación de enzimas antioxidantes que limitan su capacidad para desintoxicar los radicales libres (Matough et al., 2013).

El sistema oxido-reducción (REDOX) es muy importante para mantener la homeostasis celular. Bajo condiciones fisiológicas normales, las células mantienen la homeostasis generando un balance entre la generación y eliminación de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Los niveles moderados de ROS/RNS funcionan como señales que promueven la proliferación y supervivencia celular, mientras que un alto aumento puede inducir la muerte celular. En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre la generación y eliminación de ROS/RNS mantiene la adecuada función de la señalización de proteínas y asegura una respuesta correcta de los estímulos endógenos y exógenos. Cuando se perturba el sistema REDOX, se genera estrés oxidativo conduciendo a aberraciones que generan la muerte celular y contribuyen a enfermedades degenerativas y cáncer (Trachootham, Lu, Ogasawara, Nilsa, & Huang, 2008).

Uno de los factores claves responsables en la complicación crónica de la Diabetes Mellitus es la producción excesiva de radicales libres en las mitocondrias de células endoteliales, generando así un incremento en el estrés oxidativo. Entre más azúcar hay en los espacios extracelulares hay más azúcar en las células endoteliales para metabolizar y por tanto, más generación de radicales libres. Esta condición genera una baja actividad del sistema endógeno para proteger las estructuras celulares de los daños ocasionados por los peróxidos incrementados debido al estrés oxidativo (Drzewoski, Kasznicki, & Trojanowski, 2009).

Ya sea por un efecto dependiente o independiente de los estados de hiperglucemia, diversos estudios apoyan que la superproducción de especies reactivas de oxígeno es la primera etapa en una cascada de eventos que conduce a las complicaciones crónicas (Ceriello, 2008a).

5.3.6 Vías bioquímicas afectadas por ROS

5.3.6.1 Piezas del rompecabezas descritas por Brownlee

Los estudios de la *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) y *The United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), establecieron la relación del daño tisular inducido por la hiperglucemia en pacientes diabéticos. En el siguiente diagrama se describe la relación entre los cambios agudos en el metabolismo celular y la acumulación de cambios permanentes en las macromoléculas, causado por la hiperglucemia y el daño tisular generado. Este proceso también es afectado por factores de susceptibilidad genética del individuo y factores independientes aceleradores como la hipertensión e hiperlipidemias (Brownlee, 2005).

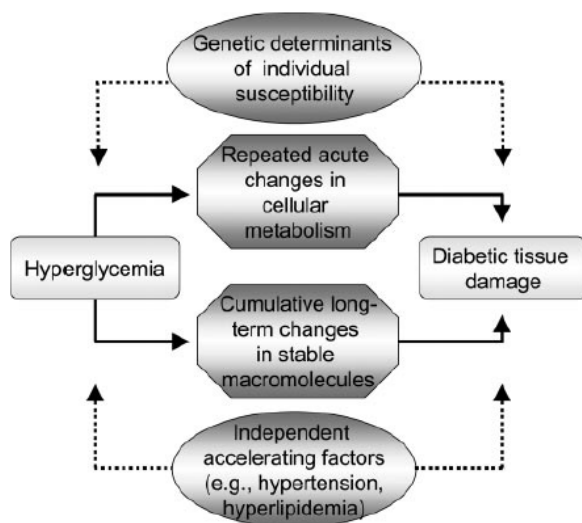


Figura 15. Modelo general como la hiperglucemia induce daño tisular (Giacco & Brownlee, 2010).

Todas las formas de la diabetes se caracterizan por la hiperglucemia, la falta relativa o absoluta de la acción de la insulina, los mecanismos de resistencia a la insulina y el desarrollo de las complicaciones macro y microvasculares. El estrés oxidativo es la causa esencial del desarrollo de las complicaciones diabéticas como consecuencia de la sobreproducción mitocondrial de superóxidos en las células endoteliales. Este grupo de células afectadas incluye células endoteliales de los capilares, células mesangiales del glomérulo renal, las neuronas y las células de Schwann del nervio periférico (Brownlee, 2005; Giacco & Brownlee, 2014).

El científico Michael Brownlee unificó cinco teorías bioquímicas conocidas desde los años 60 hasta los años 90 sobre la diabetes y los procesos de oxidación celular. Distintos estudios científicos demostraron las vías

en que la hiperglucemia intracelular aumenta excesivamente la producción de ROS, aumentado así el flujo de la vía de los polioles, la formación de productos de la glicación avanzada (AGE's), el incremento de la expresión de receptores AGE y sus ligando, la activación de la proteinasa C (PKC) y el aumento de las hexosaminas. Como consecuencia de esto, se generan residuos que afectan patológicamente la expresión de genes en la diabetes (Ceriello, 2008a; Villeneuve et al., 2011).

5.3.6.2 Hiperglucemia y daño microvascular

A. Incremento de la vía de los polioles

En condiciones normales la enzima aldosa reductasa se encarga de la reducción de aldehídos tóxicos a alcoholes inactivos. En altos niveles de glucosa, esta enzima reduce la glucosa a sorbitol para luego ser oxidada a fructosa (Figura 15). En este proceso también se consume el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), importante para la reducción del glutatión por la glutatión reductasa. Esto genera un incremento en la susceptibilidad al estrés intracelular, lo que afecta células vasculares, de nervios, retina y glomérulo (Giacco & Brownlee, 2010; Brownlee, 2005).

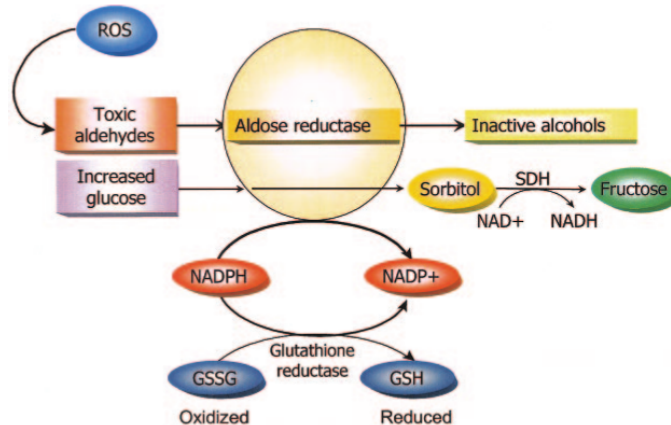


Figura 16. La hiperglucemia incrementa el flujo de los polioles (Brownlee, 2005).

B. Precursores de AGE

Los precursores de las glicaciones avanzadas se forman por las reacciones no enzimáticas de la glucosa con otros compuestos glicosilados derivados de la glucosa o de la oxidación de ácidos grasos en las células endoteliales arteriales. Entre ellos están los 3-deoxiglucosona, metilglioxal y el glioxal (Giacco & Brownlee, 2010).

La formación de AGEs causa daño de las células por tres mecanismos principales (Figura 16). 1) La modificación intracelular de proteínas involucradas en la regulación de la transcripción, 2) la difusión fuera de la célula y la interacción por proteínas receptoras de la matriz extracelular (integrinas) afectando las vías de señalización celular y por último 3) la difusión al sistema circulatorio y modificación de proteínas en la sangre e interacción con macrófagos, células endoteliales vasculares y células vasculares del músculo liso (Giacco & Brownlee, 2010; Brownlee, 2005).

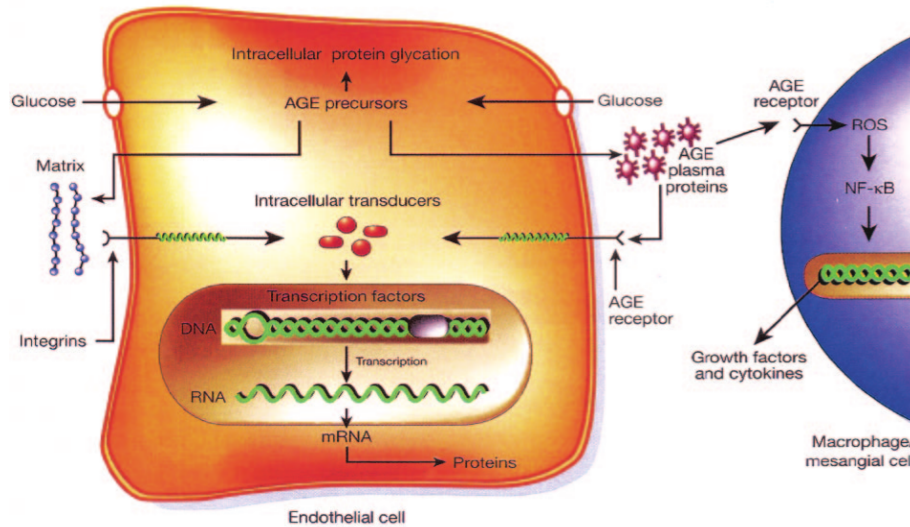


Figura 17. Consecuencias patológicas por el incremento de AGEs (Brownlee, 2005).

C. Incremento de la expresión de receptores AGEs y sus ligando

Los precursores de AGEs fuera de la célula también se unen a los receptores de AGEs (RAGE), induciendo la superproducción de ROS, activando el factor de transcripción pleiotrópico (NF-κB) causando numerosos cambios patológicos en la expresión de genes asociados a la inflamación. Igualmente se incrementa la producción de metilglioxal en células endoteliales interactuando así con otros factores epigenéticos (Giacco & Brownlee, 2010).

D. Activación de PKC

La hiperglucemia dentro de la célula incrementa la síntesis molecular del diacilglicerol (DAG). Este es un cofactor esencial para activar las diferentes isoformas de protein cinasa C (PKC). Al activarse el PKC por los altos niveles de glucosa, éste altera muchas vías metabólicas: disminuye la expresión de procesos “buenos” como del vasodilatador eNOS y aumenta lo “malo” como procesos inflamatorios, vasoconstrictores, oclusión capilar, angiogénesis y anormalidades en el flujo sanguíneo (Figura 17) (Brownlee, 2005).

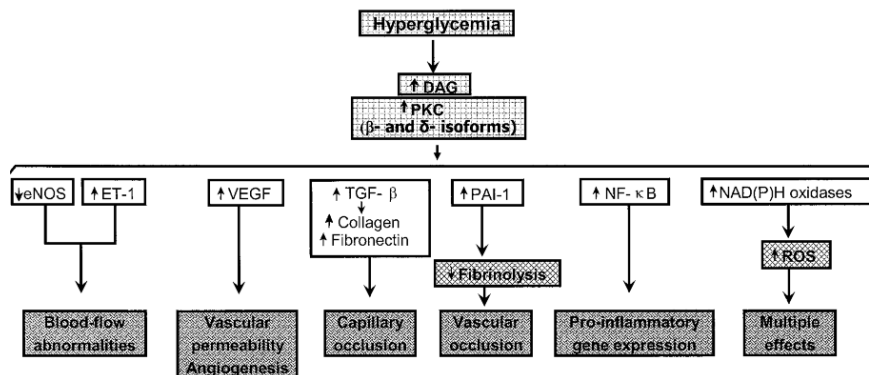


Figura 18. Consecuencia de la hiperglucemia por la activación de PKC (Brownlee, 2005).

E. Incremento de hexosaminas

El exceso de glucosa para ser metabolizada en la vía glucolítica, incrementa el flujo de las hexosaminas. Al formarse la fructosa-6-fosfato, ésta es convertida a glucosamine-6-fosfato por la enzima glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferasa (GFAT) y finalmente es transformada en UDP-acetilglucosamine (UDPGlcNAc). Ésta última es capaz de entrar al núcleo e interactuar con los grupos de serina y treonina de los factores transcripcionales, alterando la expresión génica. Lo anterior induce anomalías en el glomérulo, disfunción de los cardiomiocitos y modificación endotelial (Brownlee, 2005). La figura 18 representa la vía afectada.

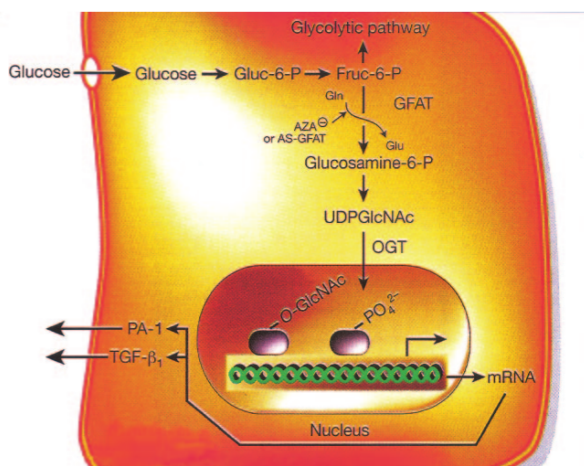


Figura 19. Incremento del flujo de las hexosaminas por la hiperglucemia (Brownlee, 2005).

5.3.6.3 La hiperglucemia induce la activación de las cinco vías, inhibiendo a GAPDH y activando a ADP-ribosa.

Durante la diabetes en humanos o animales, la hiperglucemia intracelular disminuye la actividad de la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En presencia de las enzimas termogeninas UCP-1 ó MnSOD, la inhibición de la actividad de GAPDH por hiperglucemia no genera la sobreproducción de superóxido mitocondrial. Como vimos en los mecanismos anteriores, todos los metabolitos por encima de GAPDH están aumentados. El gliceraldehído-3-fosfato activa dos vías principales, la vía de la PKC y la vía de formación de AGEs, generando el precursor metilglioxal, compuesto clave en el incremento de la expresión de RAGE que activa ligandos de S100 calgranulins y HMGB1 (Giacco & Brownlee, 2010; Brownlee, 2005).

En estudios *in vitro*, se ha demostrado como el superóxido por si solo inactiva el GAPDH (Figura 19). Estudios en tejido endotelial demostraron que el superóxido inducido por hiperglucemia inhibe la actividad de GAPDH modificando la enzima ADP-ribosa. Esto se confirmó al inhibir la producción de superóxidos con UCP-1 o MnSOD, previniendo así la modificación de GAPDH por la ADP-ribosa y la disminución de la actividad por la hiperglucemia. Esta modificación de la GAPDH por la ADP-ribosa y la reducción de su actividad por la hiperglucemia también fue prevenida por el inhibidor de la polimerasa poli (ADP-ribosa) (PARP) (Brownlee, 2005).

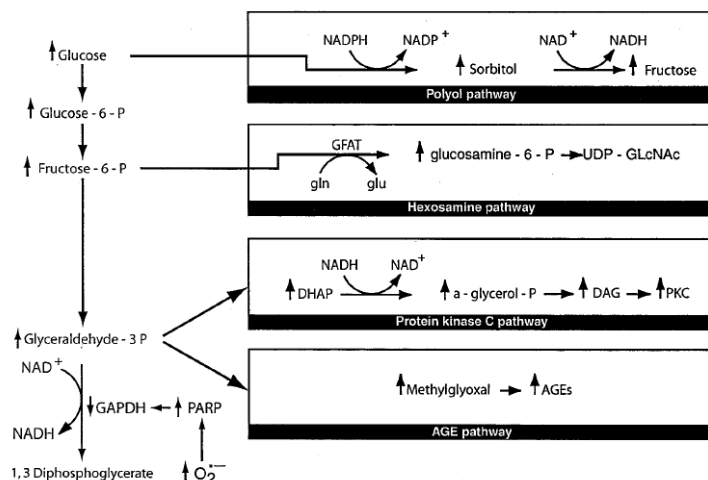


Figura 20. Sobreproducción de superóxidos mitocondriales activados por la hiperglucemia (Brownlee, 2005).

En condiciones normales PARP permanece inactivo en el núcleo y se activa durante el daño del DNA. Cuando se genera incremento de ROS mitocondrial, los radicales libres inducen rompimiento del DNA y posteriormente la activación de PARP (Figura 20). Éste a su vez crea polímeros de ADP-ribosa que se acumulan en GAPDH y otras proteínas nucleares, modificando la actividad de GAPDH y alterando las vías ya mencionadas (Brownlee, 2005, Giacco & Brownlee, 2010).

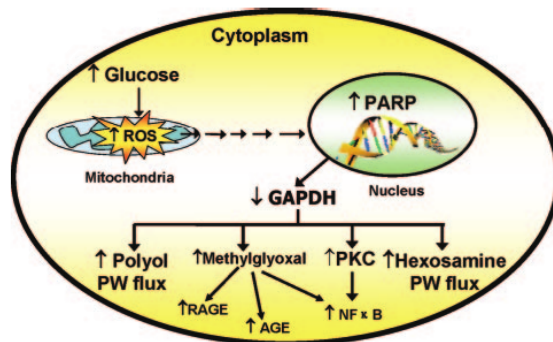


Figura 21. Esquema de los mecanismos afectados por la hiperglucemia (Giacco & Brownlee, 2010).

5.3.6.4 Resistencia a la insulina y daño macrovascular

A diferencia de las complicaciones microvasculares donde la hiperglucemia es el principal determinante de la diabetes y un cambio de la HbA1c de 5.5% a 9.5% aumenta 10 veces el riesgo, en las complicaciones macrovasculares, dicho riesgo sólo aumenta el doble. El estudio de *San Antonio Heart Study* demostró un incremento del 2.5 en las complicaciones cardiovasculares debido a resistencia a la insulina. Utilizando tejido celular y modelos animales, se encontró que la resistencia a la insulina genera el aumento en el flujo de ácidos grasos libres (FFA) fuera de los adipocitos a las células endoteliales. El incremento de estos FFA en las células endoteliales también aumenta su oxidación generando alto niveles de ROS y por el mismo mecanismo que la hiperglucemia, se genera el desbalance mitocondrial y la activación de las 5 vías bioquímicas ya mencionadas (Figura 21) (Brownlee, 2005; Giacco & Brownlee, 2010).

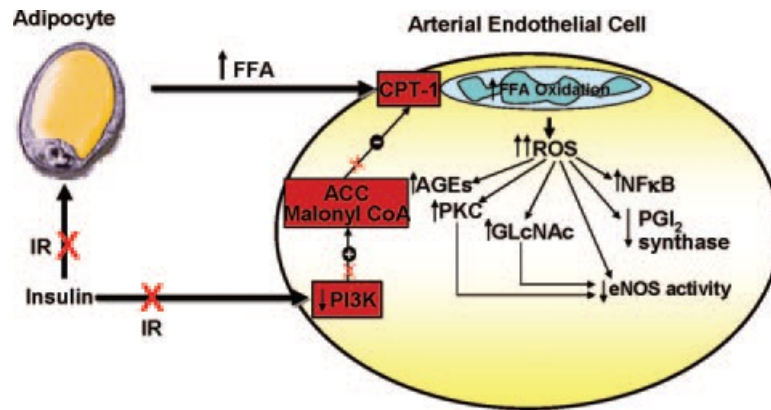


Figura 22. Rol de la resistencia a la insulina y FFAs en la formación de ROS endotelial y aterogénesis macrovascular (Giacco & Brownlee, 2010).

5.4 EPIGENÉTICA Y DIABETES

5.4.1 La problemática de la epigenética en la diabetes

La “hipótesis unificadora” propuesta por Brownlee explica la fisiopatología de los efectos de la hiperglucemia en el daño progresivo y permanente de los tejidos que conllevan a la reducción de la calidad de vida. La hiperglucemia intracelular persistente desregula procesos celulares vitales, generando la sobreproducción de superóxidos a nivel mitocondrial. Este sería el primer paso crucial en la activación de las vías que intervienen en la patogenia de la diabetes (Figura 22) (Cooper & El-Osta, 2010).

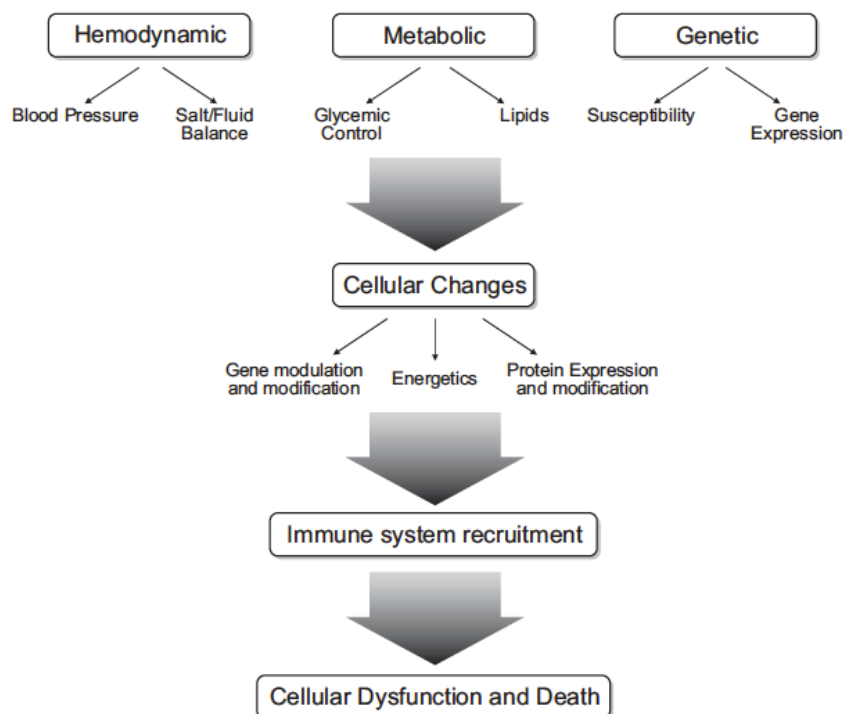


Figura 23. Resumen esquemático de las vías que contribuyen a las complicaciones de la T2DM (Forbes & Cooper, 2013).

Las modificaciones epigenéticas regulan funciones esenciales del metabolismo de los cromosomas. Conociendo los cambios moleculares de la estructura de la cromatina y la relación de alteraciones de vías moleculares se puede explicar la diabetes como un fenómeno de memoria metabólica. Aún se desconocen los mecanismos moleculares específicos que conllevan a esta memoria hiperglucémica y al desarrollo de complicaciones vasculares que siguen siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad de diabetes (Cooper & El-Osta, 2010).

El término de la “*memoria metabólica*” se utilizó para explicar un fenómeno vascular a largo plazo, sobre el pobre efecto en el control glucémico. Por mucho tiempo los estudios realizados por *Diabetes Control and Complication Trial* (DCCT) en 1983 y el seguimiento observacional de *Epidemiology of Diabetes Intervention and Complication* (EDIC) en 1994, demostraron como el control intensivo de la glucemia reduce la aparición y progresión de complicaciones de la diabetes a largo plazo incluyendo nefropatías, neuropatías y retinopatías. Los eventos cardiovasculares disminuyeron dando a conocer los efectos significativos del control glucémico (Cooper & El-Osta, 2010). Hoy en día aún no se conoce el mecanismo molecular exacto que puede estar implicado en dicha memoria metabólica.

5.4.2 Memoria epigenética hiperglucémica

Estudios más recientes han planteado que no solo la hiperglucemia persistente causa cambios en la memoria metabólica. Se ha planteado la hipótesis de que la “*memoria metabólica*” es la cascada del proceso descrito inicialmente por Brownlee, en el que la hiperglucemia intracelular induce la sobreproducción de superóxidos a nivel mitocondrial, proceso crucial en la activación de todas las vías que interviene en la patogenia y en las complicaciones (Ceriello, 2008a; Cooper & El-Osta, 2010).

Hoy en día se plantea que la producción de especies reactivas de oxígeno no sólo está relacionada con la presencia de hiperglucemia sino depende también del grado de glicación de proteínas mitocondriales. Se han determinado intermediarios claves que generan dicha memoria en la glicación de las proteínas. Las proteínas mitocondriales que sufren glicaciones avanzadas por efecto de la hiperglucemia, pero también son capaces de generar más anión superóxidos dentro de las mitocondrias, a pesar de que la glucemia se haya normalizado, activando así las mismas vías que intervienen en la generación de complicaciones en la diabetes (Ceriello, 2008a; Cooper & El-Osta, 2010).

En la figura 23 se observa como la diabetes, la hiperglucemia y las glicación de proteínas avanzadas (AGE's), activan múltiples vías de transducción de señales que incluyen el estrés oxidativo que regulan factores transcripcionales y factores epigenéticos. Estos factores son las metiltransferasas de histonas (HMT) y las acetilasas de histonas (HAT) y DNMT1 que alteran modificaciones post-traduccionales (PTM) de histonas y metilación en el DNA (meDNA) en promotores de genes inflamatorios y de la matriz extracelular, interleuquinas, factor transformante de crecimiento-B, inhibidor del activador de plasminógeno, cambiando la expresión. La persistencia en las marcas epigenéticas en regiones de genes target pueden ser un mecanismo importante en la memoria metabólica y el desarrollo de complicaciones renales y vasculares a pesar del control glucémico (Villeneuve et al., 2011).

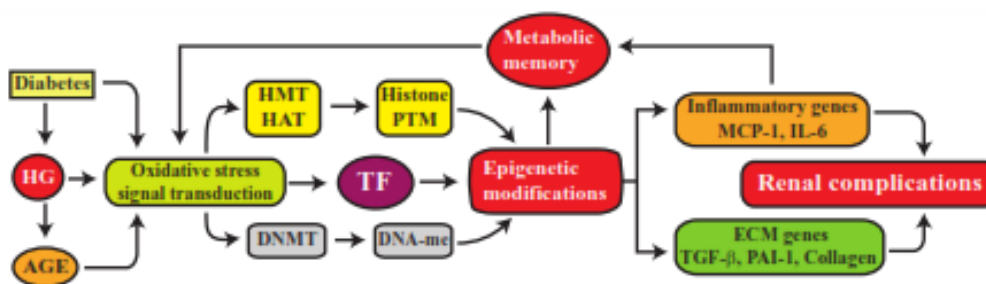


Figura 24. Memoria metabólica y mecanismos epigenéticos en la complicación de la diabetes (Ceriello, 2008a).

VI. METODOLOGÍA

6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente estudio de casos y controles, se obtuvieron cuarenta muestras de sujetos con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 y veinte muestras de controles sanos, todos los participantes asisten a consulta de endocrinología en el Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá. Los pacientes fueron reclutados con diagnóstico previo de diabetes según los criterios establecidos por la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la ADA (Asociación Americana de Diabetes). Cada individuo aceptó participar en el estudio de manera voluntaria y firmó el correspondiente consentimiento informado (ver VII. Aspectos Éticos). Se realizó una historia clínica tipo encuesta para evaluar diferentes variables para el estudio como información demográfica relevante, sexo, edad, tiempo de diagnóstico, consumo de medicamentos, alcohol y tabaco. Los formularios y los consentimientos informados fueron archivados por el investigador principal del proyecto.

Los criterios de inclusión y exclusión fueron los siguientes:

A. Criterios de inclusión

PACIENTES

- Mayor de edad.
- Diagnóstico previo de acuerdo a la Asociación Colombiana de Diabetes.
- No embarazo.
- Participación voluntaria.
- Aceptación de las condiciones del estudio por medio de la firma de un consentimiento informado.

CONTROLES

- Mayor de edad.
- Individuos sanos, sin antecedentes familiares o personales de diabetes.
- Sin diagnóstico previo de diabetes y sin antecedentes de niveles altos de glucosa en sangre.
- Aceptación de las condiciones del estudio por medio de la firma de un consentimiento informado.

B. Criterios de exclusión

- Menores de edad.
- Embarazadas.
- Diabetes gestacional.
- Pacientes e individuos controles que no deseen participar en el estudio.

6.2 RECLUTAMIENTO Y RECOLECCIÓN DE LA HISTORIA CLÍNICA DE LOS PACIENTES

Los pacientes fueron reclutados y se les realizó un diagnóstico previo de Diabetes Mellitus de acuerdo a los estándares internacionales, *American Diabetes Association* del año correspondiente. Cada individuo aceptó participar en el estudio de manera voluntaria y se firmó el consentimiento informado.

La historia de los pacientes diabéticos fue realizada por el grupo de Endocrinología de la Clínica de Diabetes de la FSFB. Se realizó una historia clínica tipo encuesta para evaluar diferentes variables para el estudio. Los formatos fueron archivados en el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes.

Se obtuvo la información demográfica relevante, incluyendo sexo, edad, tiempo de diagnóstico, consumo de medicamentos, alcohol y tabaco. Se reclutaron los individuos controles que cumplieran con los criterios de inclusión y desearan participar de manera voluntaria en el estudio.

6.3 MÉTODOS DE LABORATORIO

6.3.1 Obtención de la muestra

Se extrajeron 5ml de sangre periférica en un tubo con anticoagulante EDTA a cada individuo. Las muestras se transportaron bajo los procedimientos adecuados en cadena de frío a 4°C hasta la realización de los procedimientos.

Las cantidades necesarias para los diferentes ensayos fueron: 20µl para la medición de hemoglobina glucosilada (HbA1c), 250µl para la extracción de RNA y 3,5ml de sangre total para la extracción del DNA.

6.3.2 Pruebas clínicas de laboratorio y hemoglobina glucosilada (HbA1c)

De acuerdo a las instrucciones del fabricante se realizó la prueba de la hemoglobina glucosilada (HbA1c) con el kit comercial NycoCard™ HbA1c en un lector NycoCard™ READER II. Esta prueba se basa en una técnica de capilaridad que evalúa el control glucémico de los últimos 120 días de todos los individuos sujetos al estudio.

De acuerdo a los resultados obtenidos se establecieron tres grupos de muestras: 1) grupo control, sin antecedentes de diabetes o factores influyentes, con niveles normales de HbA1c, 2) pacientes diabéticos controlados ($HbA1c \leq 7\%$) y 3) pacientes no controlados ($HbA1c > 7\%$). Se establecieron valores normales menores a 7% de HbA1c.

6.3.3 Extracción de DNA

Para la extracción del DNA se utilizó el kit comercial de extracción de DNA CorpoGen 2000®. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se trabajó con 3,5 ml de sangre total.

Se realizaron cuatro lavados con la solución de lavado con el fin de eliminar por lisis celular la mayoría de glóbulos rojos. Cada lavado se centrifugó (14,000 rpm por 1 minuto), se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células por vórtex. Se trabajó con un volumen final de 20µl.

Se adicionaron 500 µl de la solución de tapón de lisis y se mezcló por vórtex. Para desproteinizar la preparación se prosiguió adicionando 500 µl de la solución salina, agitándolo vigorosamente hasta su homogenización. Se incubó a -20°C por 30 minutos, se microcentrifugó (14,000 rpm) por 10 minutos tomando cuidadosamente 1 ml del sobrenadante transfiriéndolo a un eppendorf de 1.5ml.

Para la precipitación del DNA se adicionaron 500 µl de isopropanol, agitándolo suavemente por inversión. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante por inversión. Se lavó dos veces con 250 µl de etanol al 70%, centrifugando cada lavado y desechando el sobrenadante por inversión. Los tubos se secaron en posición invertida sobre un papel absorbente por 5 minutos y luego se dejaron al aire por 15 minutos.

Para la reconstitución del DNA se utilizaron 100 µl de la solución de reconstitución y se dejó a 65°C por una hora. Se cuantificó su concentración en nanogramo (ng) por medio del espectrofotómetro NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC). Todas las muestras de DNA se guardaron a -20°C hasta las pruebas de ELISA.

6.3.4 Extracción de RNA

La extracción del RNA se realizó con el reactivo comercial TRIzol® LS Reagent de Life Technologies. Este método se caracteriza por mantener la integridad del RNA por medio de la inhibición de RNasas. Por seguridad frente a los reactivos que constituyen un riesgo para la salud (trizol, cloroformo e isopropanol), en la fase de preparación de la muestra, se trabajó en cámara de extracción.

El procedimiento parte de la extracción de 250µl de sangre total adicionándole 750 µl de TRIzol. Esta se homogenizó por inversión y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos nucleoprotéicos. Se le adicionaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente y se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos. Luego se centrifugó por 15 minutos a 4°C a 12,000g y se traspasó la fase acuosa a un tubo nuevo, evitando arrastrar la interfase y compuestos orgánicos.

Para la precipitación y extracción del RNA se adicionaron 500 µl de isopropanol a la fase acuosa. Se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se centrifugó por 10 minutos a 4°C a 12,000g eliminando el sobrenadante y dejando sólo el pellet.

Por último, éste se lavó con 1 ml de etanol al 75% mezclándolo por vórtex. Luego se centrifugó por 5 minutos a 4°C a 7,500g y se descartó el sobrenadante. Para secar el pellet se dejó por 10 minutos al aire y se resuspendió con agua libre de RNasas mezclándolo por inversión. Para finalizar la extracción se incubó en bloque de calor por 15 minutos a 56°C.

Inicialmente se guardó a -20°C hasta la realización del nanodrop para determinar su absorbancia y posteriormente se guardó a -80°C para su mejor conservación.

6.3.5 Cuantificación por Nanodrop

Se realizaron las cuantificaciones de las concentraciones de DNA, RNA y cDNA para cada muestra en el NanoDrop 1000. Las lecturas se realizaron con longitudes de onda de 260/280nm. Se utilizaron tasas de purezas de 1-8 para DNA y de ~2.0 para RNA. Se guardaron en las bases de datos del laboratorio para luego ser utilizadas en las PCRs.

6.3.6 Microelisas de metilación e hidroximetilación

Se cuantificó el porcentaje de metilación e hidroximetilación de cada individuo por medio de una técnica inmunológica de ELISA de fluorescencia procesada en microplacas. Para ello se utilizaron los kits de Abcam®: *EpiSeeker Methylated DNA Quantification Kit*, ab117129 y *EpiSeeker Hidroxymethylated DNA Quantification Kit*, ab117131.

Estos ensayos se basan en adherir el DNA al fondo del pozo de la microplaca. La fracción del DNA metilado o hidroximetilado es detectado utilizando un anticuerpo de captura y de uno de detección, cuya fluorescencia se cuantifica en un espectrofotómetro en unidades relativas de fluorescencia (RFU) con ondas de excitación/emisión de 530/590nm. La cantidad de DNA metilado o hidroximetilado es proporcional a la intensidad de fluorescencia medida (Figura 25)

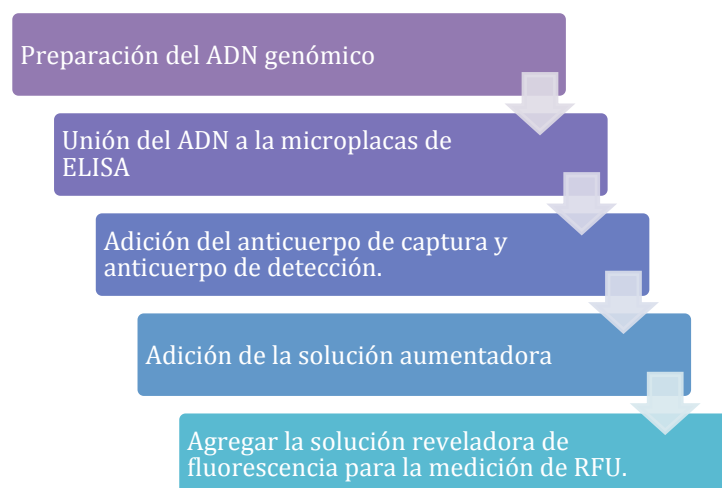


Figura 25. Diagrama de flujo para el procedimientos de las ELISA

En este experimento se partió con la extracción de DNA a partir de sangre periférica como se explicó anteriormente (Ver sección 6.3.3). El kit aportó los reactivos necesarios para la cuantificación de la metilación e hidroximetilación global de cada individuo. Se ajustaron las concentraciones de DNA a 100ng y se inició con las diluciones previas de los buffers según el protocolo.

Preparación del buffer de lavado al 1X (BL 1X):

	Volumen buffer lavado (mL)	Agua destilada (mL)	Volumen Total(mL)
96 Test	26	230	260

Tabla 7. Buffer de lavado al 1X

Para cada ensayo se realizó una curva estándar de calibración con los controles positivos y negativos aportados por el kit (Tabla 8).

Tubos	Control + (µl)		1X TE (µl)		Concentraciones del control + (ng/µl)	
	5mC (10ng/µl)	5hmC (5ng/µl)	5mC	5hmC	5mC	5hmC
1	1	0,5	19	12	0,5	0,2
2	1	1	9	9	1	0,5
3	1	1	4	4	2	1
4	2,5	2	2,5	3	5	2
5	4	5	0	0	10	5

Tabla 8. Preparación de la curva estándar de 5mC y 5hmC

Se preparó la dilución de los anticuerpos junto a la solución aumentadora. La solución reveladora de fluorescencia se preparó en un cuarto oscuro al final del procedimiento justo antes de hacer la reacción en la microplaca (Tabla 9).

REACTIVO	DILUCIÓN	VOLÚMENES (96 POZOS)	
Anticuerpo de captura	1:1000	5 µL	4,9995 mL BL 1X
Anticuerpo de detección	1:2000	2.5 µL	4,997.5 mL BL 1X
Solución aumentadora	1:5000	1 µL	4,999 mL BL 1X
Solución reveladora de RFU*	10 µL solución reveladora* 10 µL sln aumentadora de fluorescencia* 5mL diluyente*		

Tabla 9. Dilución de anticuerpos, solución aumentadora y reveladora de fluorescencia (Estos reactivos se preparan al final antes de hacer la reacción)

La unión del DNA se inició con la adición de la solución de unión a cada pozo utilizando una pipeta multicanal. Se adicionaron los buffer control y los 100ng de DNA entre 1-8 µl. Se tapó la placa con *parafilm* y se incubó a 37°C por 90 minutos. Al finalizar el tiempo se eliminó la solución de unión y se realizaron tres lavados de los pozos con 150 µl de buffer de lavado.

Se adicionaron 50 µl del anticuerpo de captura de DNA a cada pozo y se tapó e incubó a temperatura ambiente por 60 minutos. Al finalizar el tiempo se eliminó la solución del anticuerpo de captura y se realizaron tres lavados de los pozos con 150 µl de buffer de lavado.

Se agregaron 50 µl del anticuerpo de detección a cada pozo, se tapó e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Al finalizar el tiempo se eliminó la solución de detección y se realizaron cuatro lavados de los pozos con 150 µl de buffer de lavado.

Se adicionaron 50 µl de la solución potenciadora a cada pozo, se tapó e incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Al finalizar el tiempo se eliminó la solución de detección y se lavaron los pozos con 150 µl de buffer de lavado 5 veces. Finalmente, se lavó cada pozo con 150 µl con PBS al 1X.

Se preparó a oscuras la solución reveladora para detectar la señal de fluorescencia. Se preparó una mezcla de varios buffers agregando 50 µl de esta solución a cada pozo. Se incubó por 4 minutos hasta su lectura. La fluorescencia se midió en unidad de fluorescencia relativa (RFU) en un fluorómetro BioTek con ondas de excitación/emisión de 530/590nm.

6.3.7 RT-qPCR

6.3.7.1 Diseño de cebadores

Se utilizó el programa bioinformático Primer3 Plus para diseñar la secuencia de oligonucleótidos para amplificar el fragmento de interés de la región codificante de *GAPDH*, *DNMT1* y *TET1*. Se utilizó el gen GAPDH como control positivo de la reacción de PCR.

Se consideraron parámetros importantes en el diseño como la longitud de nucleótidos entre 18-24, temperatura de *melting*, temperatura de anillamiento, el contenido de GC's entre 40-60%, la estabilidad del extremo 3' con la formación de un *GC clamp*, así como la formación de estructuras secundarias o la formación de dímeros de *primers* (cebadores) teniendo en cuenta los valores menores a 4 de los ANY y SELF ANY.

Los cebadores de la qPCR se diseñaron a partir del cDNA y se verificaron por medio del programa BLASTN para asegurar que no fueran complementarios con otras secuencias nucleotídicas en el genoma (Tabla 10).

Gen	Secuencia de cebadores	
GAPDH	Forward	5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3'
	Reverse	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'
DNMT1	Forward	5'- GCACGAATTTCTGCAAACAG-3'
	Reverse	5'- CACTTCCCGGTTGTAAGCAT-3'
TET1	Forward	5'-TTCTGACAAGAGCTGGAGCA-3'
	Reverse	5'-TGGAACCTTTTTGGATTTGG-3'

Tabla 10. Cebadores de control y amplificación

6.3.7.2 Estandarización de cebadores por PCR convencional

Se prepararon los cebadores de los genes *GAPDH*, *DNMT1* y *TET1* a concentraciones finales de 500nm. De esta dilución se utilizó 1 µl de cada cebador para un volumen final de 20 uL. Se utilizaron muestras problema para la estandarización. Se evaluó la actividad correcta de los cebadores en una PCR convencional utilizando el kit de Promega Go Taq Green (Tabla 11).

	Volumen Final 20 µl
Agua (ddH₂O)	7 µl
Master Mix	10 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
cDNA	1 µl

Tabla 11. Volumen de PCR convencional

Las condiciones en el termociclador se encuentran en la siguiente tabla.

Programa del termociclador		Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial		95°C	2 minutos
30 Ciclos	Denaturación	95°C	45 segundos
	Anillamiento	55°C	1 minuto
	Extensión	72°C	30 segundos
Extensión final		72°C	5 minutos
Infinito		4°C	

Tabla 12. PCR convencional Go Taq Green

6.3.7.3 Síntesis de la primera hebra de cDNA

Se utilizó el kit de Promega ImProm-II™ Reverse Transcription System para la realización de la primera hebra de cDNA a partir del RNA total. Este kit incluye la transcriptasa reversa y los reactivos necesarios para optimizar la eficiencia en la síntesis de copias del DNA complementario (cDNA).

En la síntesis de la primera hebra del cDNA se utilizaron los oligonucleótidos de timina (oligo dT), obtenidos en el kit. Se realizó una primera reacción con los volúmenes indicados en la tabla 13. El agua utilizada era libre de RNasas. Esta mezcla se colocó en el bloque de calor a 70°C por 5 minutos y rápidamente en hielo por 5 minutos. Se prosiguió con un spin para precipitar toda la mezcla (Tabla 13).

	Volumen Final 5 µl
Agua	2 µl
Oligo dT *2	0.5 µl
ARN	2 µl

Tabla 13. Volúmenes para la síntesis de la primera cadena cDNA

Para la segunda reacción de la cadena se mezcló la reacción principal con los reactivos en la tabla 14. Previamente se hizo la respectiva dilución del MgCl₂ a 6mM. Se mezclaron los componentes para un volumen final de 20 µl y se colocó en el termociclador para su posterior amplificación (Tabla 14).

	Volumen Final 20 µl
Agua	6.2 µl
Buffer de RXN Im-PromII™	4 µl
MgCl ₂ (6mM)	2.8 µl
dNTP's	1 µl
Retrotranscriptasa de Im-PromII™	1 µl

Tabla 14. Segunda reacción para la síntesis del cDNA

La siguiente tabla resume las condiciones establecidas en el termociclador. Esta reacción se realizó en un termociclador convencional.

Programa de termociclador	Temperatura	Tiempo
Anillamiento	25°C	5 min
Extensión	42°C	60 min
Infinito	Mantenido en 4°C	

Tabla 15. Condiciones de la síntesis de primera hebra en el termociclador

El cDNA amplificado se guardó a -80°C para su conservación.

6.3.7.4 Reacción de PCR convencional para el control positivo GAPDH

Se utilizó el gen constitutivo GAPDH como control positivo de la reacción de la PCR. Esta prueba se realizó con una PCR convencional con el kit de Promega Go Taq Green. Se realizó la desactivación de la retrascriptasa a 70°C por 15 minutos en el termociclador, antes de iniciar.

Para la prueba de GAPDH se realizó la siguiente reacción presentada en la tabla 16. Los cebadores de GAPDH se reconstituyeron a 10mM. Para un volumen final de 20 µl de la reacción y una concentración final de 500nM se realizaron alícuotas de 1 µl y 10 µl. Se trabajó con una *temperatura de melting* (T_m) de 58°C.

	Volumen Final 20 µl
Agua	7 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Master Mix Go Taq Green	10 µl
cDNA	1 µl

Tabla 16. Volúmenes para la PCR convencional

Se colocó la reacción en el termociclador con las siguientes condiciones de PCR.

Programa del termociclador		Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial		95°C	2 minutos
30 Ciclos	Denaturación	95°C	45 segundos
	Anillamiento	58°C	1 minuto
	Extensión	72°C	30 segundos
Extensión final		72°C	5 minutos
Infinito		4°C	

Tabla 17. Condiciones del control positivo para GAPDH

6.3.7.5 Gel de electroforesis en agarosa para los controles de GAPDH

Se realizó un gel de agarosa al 1.5% para visualizar los resultados de la PCR realizada para el control positivo de la reacción de GAPDH. Para su gelificación, se utilizó el buffer TBE al 0.5X, los gramos correspondiente de agarosa según el tamaño de la cámara que varían entre 0.8-1.6 gramos de agarosa y el buffer de corrido TBE al 0.5X. Las condiciones de corrido fueron de 40-50 minutos con 80 voltios y 400 MA. Para la visualización se utilizó el intercalate Ez vision.

Se visualizaron las bandas del marcador de peso y las de GAPDH para cada individuo. Utilizando un fotodocumentador y el programa Gel Doc se confirmó por medio de fluorescencia el tamaño de interés de 496 pb.

De las muestras que resultaron negativas para GAPDH, se volvieron a sintetizar sus respectivos cDNA.

6.3.7.6 Reacción de qRT-PCR de los genes *DNMT1* y *TET1*

Por medio de técnicas cuantitativas de PCR, se realizó la amplificación de los fragmentos de interés con el kit Power SYBR® Green PCR Máster Mix de Applied Biosystem®. Este método utiliza una AmpliTaq Gold DNA polimerasa que se caracteriza por su alta sensibilidad y por su funcionalidad de Hot-Start.

Este método de amplificación se basa en la unión de la tinción SYBR Green a la doble cadena de DNA, proporcionando una señal fluorescente que refleja la cantidad de producto generado durante la PCR. El SYBR Green es un compuesto orgánico que interactúa con la hendidura menor del DNA, introduciéndose en la estructura secundaria de la doble hélice y acoplándose energéticamente a los ácidos nucleicos. Esta unión emite fluorescencia por medio de un fenómeno llamado *transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia* (FRET). La lectura es realizada analizando picos de absorción de longitudes de onda (λ), $\lambda = 498\text{nm}$ de absorción y $\lambda = 522\text{nm}$ de emisión (Figura 25).

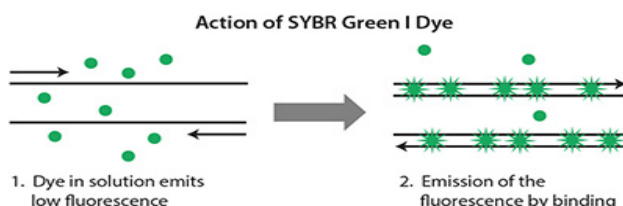


Figura 26. Acción del SYBR Green

Antes de iniciar las cuantificaciones en el proyecto, se realizó la optimización de las concentraciones de los cebadores para determinar la concentración mínima de expresión que dé como resultado el menor umbral de ciclo (C_T) y el máximo ΔR_n para así reducir las amplificaciones inespecíficas (Tabla 18).

cDNA	GAPDH, DNMT1 & TET1(nM)	GAPDH, DNMT1 & TET1 (nM)
------	-------------------------	--------------------------

(ng/ μ l)	Forward				Reverse			
25	50	100	250	500	50	100	250	500
50	50	100	250	500	50	100	250	500
200	50	100	250	500	50	100	250	500
500	50	100	250	500	50	100	250	500

Tabla 18. Estandarización de concentraciones

A partir de una muestra problema ya conocida, se trabajó para buscar las concentraciones óptimas de cDNA y cebadores para utilizar en el procedimiento. Se ajustó la concentración de cDNA a cuatro concentraciones (25, 50, 200, 500 ng/ μ l) distintas y se evaluaron cada uno con cuatro concentraciones (50, 100, 250 y 500 nM) distintas de cada primer para cada gen (*GAPDH*, *DNMT1* y *TET1*).

Los volúmenes para la PCR variaron según las concentraciones de DNA y cebadores.

Las condiciones del termociclador se encuentran en la siguiente tabla:

Programa del termociclador		Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial		95°C	10 min
40 Ciclos	Denaturación	95°C	30 seg
	Anillamiento	58°C	45 seg
	Extensión	72°C	45 seg
Curva de disociación			

Tabla19. Condiciones de PCR cuantitativa

Las pruebas con mejor perfil de expresión para cada una de las muestras y genes amplificados fueron:

GEN	Cebadores	cDNA
GAPDH	500 nM	25 ng/ μ l
DNMT-1	500 nM	25 ng/ μ l
TET-1	500 nM	25 ng/ μ l

Tabla 20. Concentraciones óptimas de cebadores

Teniendo en cuenta las concentraciones de cDNA para cada individuo, se diluyeron a 100 ng/ μ l. Las concentraciones iniciales del cDNA eran de 2000ng/ μ l y se adicionaron 20 μ l a cada tubo. Todos los cebadores se trabaron a concentraciones de 500 nM (Tabla 20).

Para la reacción de la PCR cuantitativa se trabajó con un volumen final de 20 μ l. Los volúmenes se pueden observar en la Tabla 21. Este experimento se realizó en una placa de PCR *MicroAmp® optical 96 well plate* y se montó la curva de calibración por cada experimento. Cada gen de cada individuo se evaluó por triplicado y el control positivo GAPDH se evaluó por duplicado. Se analizaron 16 individuos por cada placa.

	Volumen (μ l)	Concentración final
Power SYBR® Green PCR MM	10	1X
Primer Forward	1	500ng
Primer Reverse	1	500ng
Templado	1	100ng
ddH ₂ O	7	-
Total	20	-

Tabla 21. Volúmenes de la qPCR

Las amplificaciones en tiempo real en el aparato de Applied Biosystem® 7500 Fast Real-Time PCR de la Universidad de los Andes. Antes de iniciar la amplificación se requiere 10 minutos a 95°C para la activación de la AmpliTaq Gold DNA polimerasa, UP para mejor sensibilidad.

Las condiciones de los ciclos fueron son:

Programa del termociclador		Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial		95°C	10 min
40 Ciclos	Denaturación	95°C	30 seg
	Anillamiento	55°C	45 seg
	Extensión	72°C	45 seg
Curva de disociación			

Tabla 22. Condiciones de la PCR cuantitativa

La medición se trata de la cuantificación relativa de los amplicones. Se basa en la detección simultánea de dos segmentos de DNA en el cual uno representa el target, los genes de interés y el gen constitutivo GAPDH. Se hace una detección simultánea de ambos genes y al final la concentración se determina con base a la concentración del amplificado interno.

6.3.8 Microarreglos

Se analizaron un total de 416 microarreglos extraídos de la base de datos de NCBI Gen Expression Omnibus (GEO) (Edgar et al., 2002). Se obtuvieron los resultados de distintos estudios con distintas plataformas para varios tejidos afectados en diabetes. Para análisis de metilación del DNA se recolectaron 267 arreglos de la plataforma Illumina Human Methylation 27 BeadChip de los siguientes estudios: GSE21232, GSE34008, GSE38291, GSE20067; en los que se analizaron casos y controles en muestras de sangre periférica, islotes pancreáticos, tejido adiposo y músculo. Por otra parte, para los análisis de expresión génica se obtuvieron 125 arreglos: 45 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array de los estudios GSE27949, GSE19420, GSE55098; 63 Affymetrix Human Genome 1.0 ST Array del estudio GSE38642 y 17 Illumina HumanRef-8 v3.0 expression beadchip del experimento GSE21321, en los que se analizaron igualmente muestras de casos y controles de sangre periférica, islotes de páncreas, tejido adiposo y músculo (Tabla 23).

Tipo de Estudio	Plataforma	Tejidos	# Pacientes	# Controles	GEO Accession #
Arreglo de expresión	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array	Islotes pancreáticos	9	54	GSE38642
Arreglo de expresión	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array	corazón	7	5	GSE26887
Arreglo de metilación	HumanMethylation27 BeadChip	Músculo esquelético y Tejido adiposo subcutáneo	16	16	GSE38291
Arreglo de metilación	HumanMethylation27 BeadChip	Islotes pancreáticos	5	11	GSE21232
Arreglo de metilación	HumanMethylation27 BeadChip	Sangre total	195	0	GSE20067, GSE34008, GSE57285, GSE61611

Arreglo de expresión	Exiqon miRCURY LNA microRNA Array	Músculo esquelético y Tejido adiposo subcutáneo	9	9	GSE26168
-----------------------------	-----------------------------------	---	---	---	----------

Tabla 23. Tabla descriptiva de microarreglos

Para los resultados de los microarreglos se realizó un análisis de algoritmos de clusterización que busca las características similares dentro de un conjunto de datos. Se analizaron relaciones complejas de carácter multivariado e identificación a través de espacios de múltiple dimensiones, elementos anómalos (outliers). Los datos multivariados obtenidos en la matriz se montaron al programa Gene Cluster 3.0. La técnica de análisis de agrupamiento utilizada fue la de similaridad métrica. Esta técnica forma grupos de elementos de manera que los datos que pertenecen a un grupo de elementos sean parecidos entre si. Esto se visualizó en JavaView.

Para el análisis de expresión diferencial se realizó en el software Chipster. Este software contiene herramientas para el análisis de microarreglos de última generación. El resto de los análisis se realizaron en el programa de R.

6.4 DIAGRAMA METODOLÓGICO

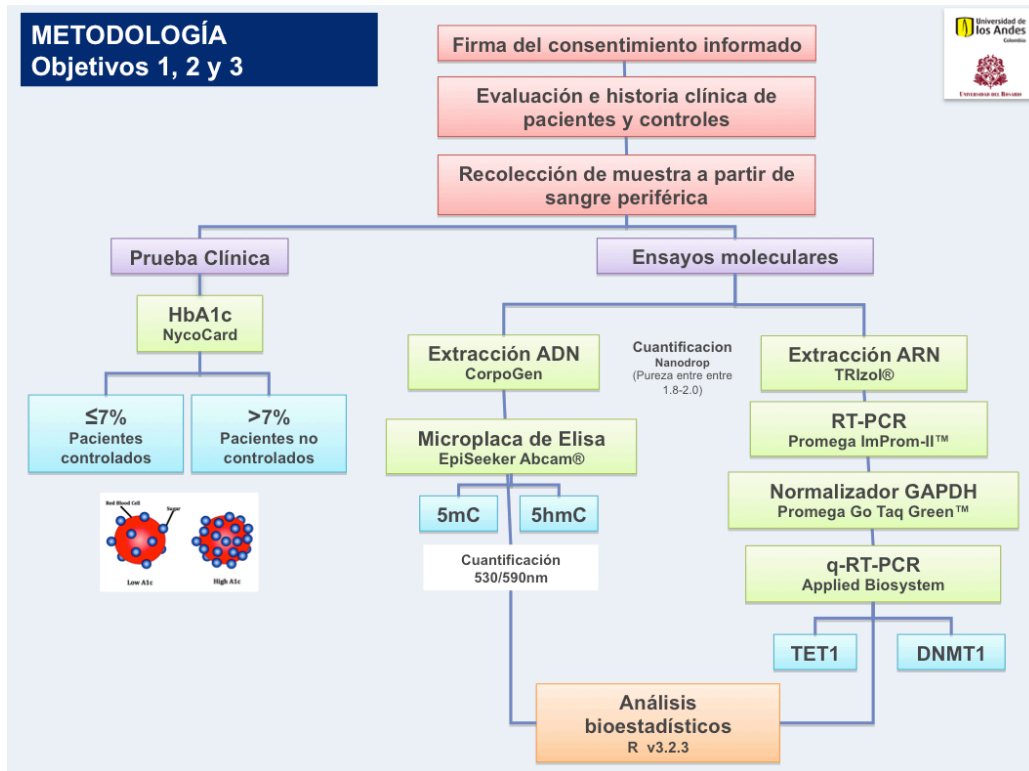


Figura 27. Diagrama de flujo metodológico del estudio molecular de pacientes del HFSF.

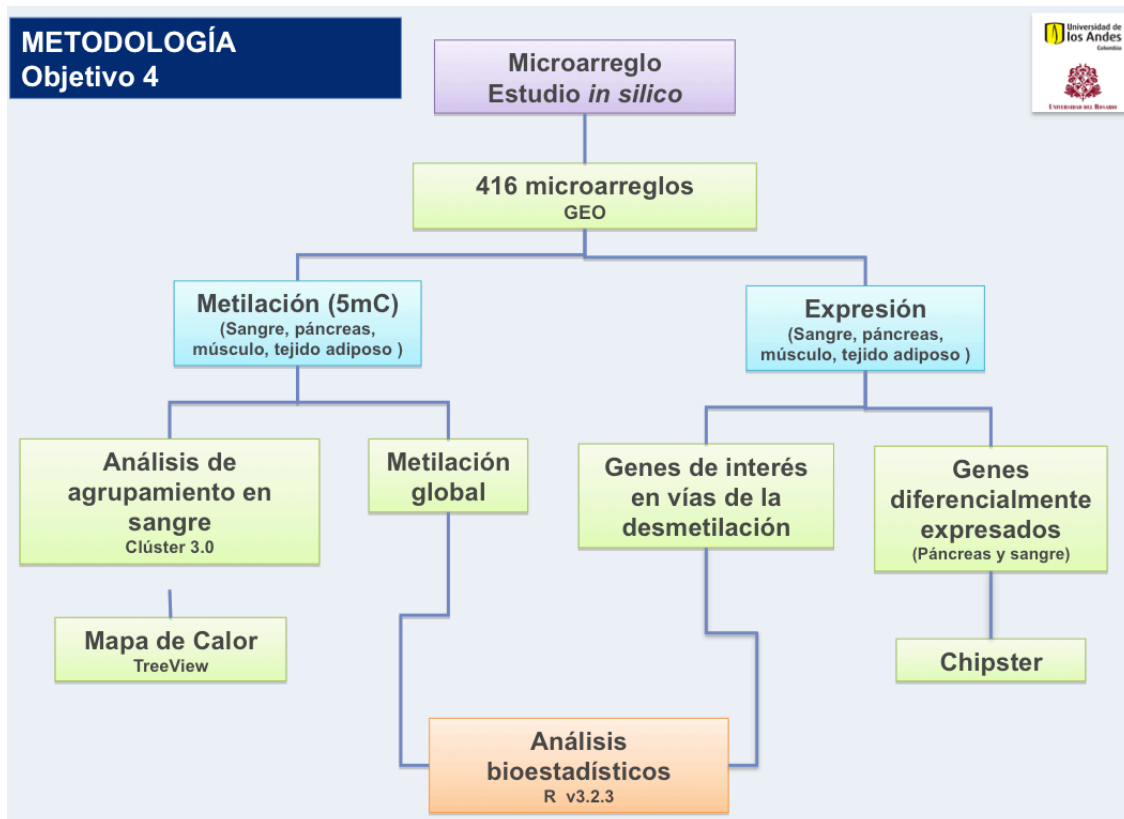


Figura 28: Diagrama de flujo metodológico del estudio *in silico*.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y BIOINFORMÁTICOS

El análisis estadístico inició con la caracterización demográfica de los sujetos y el cálculo de las frecuencias de las variables estudiadas obteniendo los promedios, desviaciones estándares, medias y medianas para los datos cuantitativos.

6.5.1 Análisis estadísticos de las microelisas

Para obtener los porcentajes de metilación e hidroximetilación, se utilizó el control negativo comercial del kit para ajustar las unidades de fluorescencia relativa (RFU). Para cada experimento se realizó una curva de calibración con diluciones del DNA (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ng/μL para 5mC y 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 ng/μL para 5hmC). La cuantificación absoluta de los resultados se realizó a partir de los datos de RFU de la curva estándar versus la cantidad de la misma de los controles. Para determinar la pendiente de la curva estándar se realizó una regresión lineal de la RFU/ng. Se prosiguió con el cálculo de la cantidad y porcentaje del DNA metilado por triplicado por medio de las siguientes fórmulas.

$$5mC(ng) = \frac{RFU \text{ de cada muestra} - RFU \text{ control negativo}}{Pendiente \times 2}$$

$$5mC\% = \frac{Cantidad \text{ de } 5mC \text{ en ng}}{S} \times 100$$

Fórmula 1. Cálculos del porcentaje de 5mC S: cantidad de DNA en ng. *2: factor para normalizar el control (+) de 5mC al 100%; el control positivo tiene el 50% de 5mC.

$$5hmC(ng) = \frac{RFU \text{ de cada muestra} - RFU \text{ control negativo}}{Pendiente \times 5}$$

$$5hmC\% = \frac{Cantidad \text{ de } 5hmC \text{ en ng}}{S} \times 100$$

Fórmula 2. Cálculos del porcentaje de 5hmC. S: cantidad de DNA en ng. *5: factor para normalizar el control (+) de 5hmC al 100%; el control positivo tiene el 20% de 5mC.

Se crearon las tablas de los resultados de las ELISAS de metilación e hidroximetilación adicionando variables pertenecientes a los datos del % de 5mC, 5hmC y HbA1c, control glucémico, edad y tiempo de diagnóstico, consumo de alcohol y tabaco y frecuencias del consumo. Igualmente se formaron grupos según el control glucémico de los individuos (1. controles, pacientes; 2. controles, pacientes controlados, pacientes no controlados; 3. controles y pacientes, pacientes no controlados). A partir de esta información se realizó una matriz en formato TXT y el análisis estadístico se realizó con el software R Statistic versión 3.3.0. Se calculó la normalidad de todas las variables con el test de Shapiro-Wilk y se visualizaron en forma de histograma.

Al evaluar la normalidad de los datos, se obtuvieron valores $p > 0.05$ y se estableció que los porcentajes de 5mC y 5hmC no siguen una distribución normal y por esa razón se trabajó con pruebas no-paramétricas. Para el análisis de dos categorías (el efecto de 5mC y 5hmC según sexo, tiempo de diagnóstico, edad, consumo de alcohol o tabaco), se realizó la prueba de Wilcoxon que compara la mediana de dos muestras

relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas. Para el análisis de dos o mas grupos se aplicaron la prueba de Kruskal-Wallis y el ensayo de Dunn para comprobar si un grupo de datos proviene de la misma población. Para asociar la 5mC y 5hmC a las variables del estudio se utilizaron las pruebas de correlación de Spearman y rango de Kendall.

6.5.2 Análisis estadísticos de RT-qPCR

A partir de los resultados de las C_t obtenido de la RT-qPCR para cada gen, se realizó una matriz en Microsoft Excel para sacar el promedio de cada muestra realizada por triplicado para *DNMT1*, *TET1* y *GAPDH*. Se calculó la mediana de los sujetos controles y se utilizó ese valor como valor de referencia control. Con la información obtenida de la eficiencia y el promedio de los C_t de cada gen se realizaron los cálculos para el ΔC_t y $\Delta\Delta C_t$, usando como gen normalizador el *GAPDH* para así calcular la cuantificación relativa de *DNMT1* y *TET1*. Este último dato es adjuntado a la matriz general de los resultados de las microelisas y todas las variables para llevar a cabo un análisis en conjunto. Se tomaron niveles de expresión significativos según valores de p menor a 0.05. Los cálculos se realizaron con las siguientes fórmulas.

$$R = 2^{[C_p \text{ sample} - C_p \text{ control}]}$$

$$R = 2^{\Delta C_p}$$

$$R = 2^{-[\Delta C_p \text{ sample} - \Delta C_p \text{ control}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_p \text{ target}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta C_p \text{ Ref}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}$$

Fórmula 3. Fórmulas para la cuantificación relativa de la RT-qPCR

Los análisis estadísticos se realizaron en R, para determinar la normalidad de los datos se realizó la prueba de Shapiro-Wilk y se visualizaron en histogramas. Los datos de *DNMT1* se trabajaron como no normales mientras que los datos de *TET1* como normales.

Se realizaron pruebas de correlación de Spearman y Kendall para la asociación de la HbA1c y la expresión de los genes de interés *DNMT1* y *TET1*. Para la comparación de los grupos y las diferencias en la expresión de los genes de interés se realizó la prueba de Wilcoxon para controles y pacientes y la prueba de Kruskal-Wallis para controles, pacientes controlados y pacientes no controlados. Se realizaron pruebas de correlación de Spearman y Kendall para la cuantificación relativa y los porcentajes de metilación e hidroximetilación, edad y tiempo de diagnóstico. Por último, se analizó la cuantificación relativa según sexo, consumo de tabaco y consumo de alcohol utilizando la prueba de Wilcoxon para *DNMT1* y la prueba T-student para *TET1*.

6.5.3 Análisis estadísticos y bioinformáticos de microarreglos

El análisis de agrupamiento (clusterización) se realizó a partir de los datos de sangre periférica de pacientes diabéticos y controles con el software Gene Cluster 3.0. Las matrices en formato TXT se cargaron en el programa y se establecieron las condiciones del análisis dejando los filtros de los datos por defecto.

Estos remueven genes que han perdido valores y datos no informativos. Los datos se ajustaron con transformaciones $\text{Log}_2(X)$ y se realizó *median-polish* para centralizar los datos de genes y arreglos alrededor de la mediana. Esto último se hace para eliminar los posibles sesgos y los datos extremos por fuera de las distribuciones (*outliers*). Los datos de genes y arreglos se normalizaron para ajustar la suma de los cuadrados a 1.

Para el análisis de clusterización se realizó un agrupamiento jerárquico que consiste en obtener grupos de elementos de la matriz de asociación en el cual se estructuran los grupos de diferentes niveles de similitud en todas las posibles combinaciones. Este organiza los genes en un dendograma. El método de agrupamiento es de ligamiento centroeide que se basa en agrupar elementos y variables utilizando la distancia euclidiana entre los centros de los cluster a comparar. Esta se caracteriza por representar una simplificación del promedio no ponderado. Los resultados de este análisis se visualizaron con el software TreeView 1.1.6r4. para generar un mapa de calor que es representado por colores según metilación.

Para la comparación de la metilación global de los tejidos de sangre periférica, músculo esquelético, tejido adiposo y tejido pancreático se realizó una suma de los valores de metilación para cada microarreglo. Con estos resultados se realizó el análisis diferencial de metilación que se visualiza en un boxplot en el software estadístico R versión 3.3.0 (<http://www.r-project.org>).

El análisis de los genes asociados a las rutas de la desmetilación pasiva y activa del DNA se realizó a partir de los microarreglos de metilación y expresión. Se llevo a cabo en el programa R en la cual se determinó la normalidad de los datos por medio de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas por la prueba F. Para el análisis de las variables se realizaron pruebas T de Student, T de Welch o prueba de rangos de Wilcoxon junto a sus gráficas correspondientes.

El análisis de metilación y expresión diferencial de genes se realizó en Microsoft Excel 2011 v14.6.4 por medio de un análisis de varianzas y modelamiento lineal a partir del paquete *limma* de Bioconductor y EmpiricalBayes por medio del software Chipster v.3.8.1 (<http://chipster.csc.fi>). Para la realización del análisis se cargar el archivo de expresión diferencial de tejido pancreático.

En la herramienta de normalización de datos se selecciona el procesamiento de datos prenormalizados, ya que los datos descargados de la base de datos de GEO ya se encuentran previamente procesados. El resultado arroja un *phenodata*, el cual se edita para designar los pacientes y controles de cada microarreglo. A partir de esta modificación se escoge el método estadístico de modelo lineal, el cual fue realizado por medio del paquete *limma*, que escoge los genes diferencialmente expresados. Por último, se visualizan estos resultados mediante *Volcano Plots*. En estos gráficos, se escogieron genes con *fold changes* superiores a 1.00 e inferiores a -1.00.

VII. ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de los Andes y del Hospital Universitario Fundación Santa Fe de Bogotá. Los datos obtenidos se organizaron en una base de datos que es archivada y custodiada por el investigador principal. Los datos generados en el desarrollo del proyecto fueron registrados y archivados por el responsable del procedimiento, quien mensualmente entregó una copia de los mismos al investigador principal. Cada participante recibió un código de identificación y se protegió la privacidad del individuo. Este estudio es considerado una investigación de riesgo mínimo según criterios establecidos por la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud” acerca de la investigación en seres humanos. En ningún momento se advirtió ningún riesgo o daño para la salud de ninguno de los sujetos en quienes se realizó la investigación.

Los estudios se realizaron con muestras de sangre periférica, lo cual no tiene ningún impacto en el tratamiento de los pacientes quienes son seguidos en protocolos ya establecidos. La información que se desprendió del estudio puede generar información relacionada con el diagnóstico y el pronóstico tal como la literatura lo refiere y se pondrá a disposición de los clínicos.

Para la recolección del material biológico de los participantes, el lugar de ejecución del proyecto contó con las instalaciones y equipo de laboratorio de acuerdo con las normas técnicas del Ministerio, que garantizaron el manejo seguro de las muestras. El laboratorio disponía de un manual de procedimientos y personal adiestrado para la manipulación de las muestras.

Todo procedimiento fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad y así proceder con la autorización para ser aprobado por el Comité de Ética de la Fundación Santa Fe. Se tuvieron en cuenta las normas nacionales establecidas en la Resolución 8430 del Ministerio de Protección Social y normas internacionales basadas en la última revisión de la Declaración de Helsinki 2013.

Toda información se manejó de manera confidencial. Los investigadores no tuvieron acceso a la identificación de algún individuo. Para proteger la identidad de los participantes, se crearon códigos y los resultados se presentaron de forma anónima. Los participantes de este estudio fueron informados sobre el mismo y se les pidió su consentimiento informado a través del siguiente formato:

FORMATO PARA EL CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO: Caracterización de la vía de desmetilación del DNA y sus implicaciones en las complicaciones de la Diabetes Mellitus

Tipo de Consentimiento: Estudios genéticos y epigenéticos

CONSENTIMIENTO Y AUTORIZACIÓN

El Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes en colaboración con el Programa de Diabetes de la Fundación Santa Fe, están desarrollando el proyecto de investigación titulado "Caracterización de la vía de desmetilación del DNA implicada en las complicaciones de la Diabetes Mellitus". El propósito del mismo es estudiar los mecanismos moleculares que desencadena las complicaciones asociadas a la Diabetes, conociendo como y por que vías se producen y se fijan en el genoma del paciente. La ejecución del presente proyecto permitirá a los grupos proponentes abordar el estudio de la Diabetes, en relación con los cambios epigenéticos que ella puede ocasionar en el organismo.

Su participación en el proyecto es completamente voluntaria. Si usted decide hacer parte del mismo, se procederá a diligenciar un consentimiento informado y a la obtención de un vial de sangre periférica del que se obtendrá el ADN de sus células sanguíneas sobre el que se llevará el estudio.

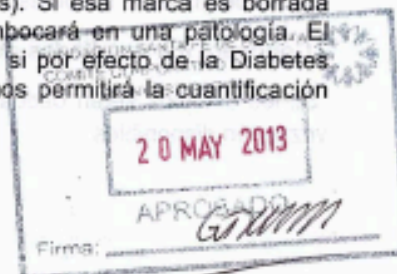
Este formato de consentimiento cuenta con información que lo ayudará a decidir si desea participar. Tome el tiempo que requiera, lea cuidadosamente este formato, y formule las preguntas que tenga al médico o personal del estudio.

¿Qué son los cambios epigenéticos?

La epigenética es la ciencia que se dedica al estudio de la regulación del genoma que no depende de la propia secuencia de este. Dentro de los genes que componen nuestro genoma hay ciertos cambios que pueden asociarse a una enfermedad. Muchas veces esos cambios son en la propia secuencia del gen, lo que puede generar un gen anormal y que funcione mal, provocando la enfermedad, lo que normalmente se conoce como mutación genética. Sin embargo, en otras ocasiones es la regulación del gen lo que causa el trastorno. El principal método de regulación epigenética es a través de un grupo químico denominado Metilo. Los genes altamente metilados no realizan su función y lo contrario pasa si se eliminan los metilos. En este estudio creemos que parte de las complicaciones de la Diabetes se deben por una pérdida fortuita de metilos en determinados genes, lo cual hace que se expresen erróneamente. Por ello es interesante conocer como es el mecanismo de esta pérdida de metilos y sobre que genes puede estar actuando.

¿En qué consiste el análisis del ADN extraído de la sangre periférica?

El ADN contiene toda la información genética del organismo y parte de la información epigenética. El grupo Metilo que puede aparecer en el ADN determina que proteínas habrá en la célula (Proteínas que vienen de genes activos). Si esa marca es borrada aparecerán proteínas que no deberían estar y esto desembocará en una patología. El análisis que llevaremos a cabo sobre su ADN nos indicará si por efecto de la Diabetes esta ocurriendo un borrado de esa metilación del ADN y nos permitirá la cuantificación estos cambios entre grupos de pacientes y controles.



¿Por qué se me está pidiendo que autorice el uso de sangre periférica para estos análisis?

Se le está solicitando que autorice que una muestra de su sangre sea utilizado para este estudio debido a que estas muestras contienen el ADN y las células del sistema inmune necesarias para la realización de los estudios de metilación.

Su aceptación para proporcionar esta muestra es opcional y depende totalmente de usted, de contar con ella dependerá que podamos incluirlo en el proyecto.

¿Qué efectos adversos (negativos) puedo sufrir al donar una muestra de sangre periférica?

Se extraerá una cantidad de sangre venosa de 5 ml para estos análisis correspondiente a un tubo de ensayo, esta cantidad es similar a la que usualmente se toma para realizar exámenes de rutina en el laboratorio clínico; este procedimiento es considerado como de riesgo mínimo. Puede sentirse además del dolor natural de la punción una leve molestia o la presencia de equimosis o un pequeño hematoma en el sitio de punción. Este procedimiento que no pondrá en peligro la vida y tanto el equipo médico, como el Laboratorio de Genética Humana estará atento contra cualquier evento adverso que pueda ocurrir.

¿Cómo se guardarán estas muestras de sangre periférica y quién podrá utilizar la información que se obtenga de los resultados?

Las muestras serán procesadas en el Grupo de genética de la institución universitaria. Adicionalmente, esta muestra de sangre periférica serán almacenadas en forma segura y se etiquetarán sólo con un número único durante un máximo de 36 meses, estas muestras serán empleadas para el análisis de metilación del ADN. La información que lo identifica directamente, es decir, su nombre, iniciales, dirección y número de teléfono se archivarán en una base de datos; los cuales serán exclusivamente utilizados por los investigadores en la determinación de los marcadores moleculares o genéticos mencionados. Adicionalmente toda la información que usted suministre y aquella obtenida en la investigación serán manejadas confidencialmente, y no serán utilizados para fines distintos a los científicos. Adicionalmente, usted puede contar con la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio si así lo desea.

¿Se me permitirá tener acceso a la información que se recopile de estos estudios?

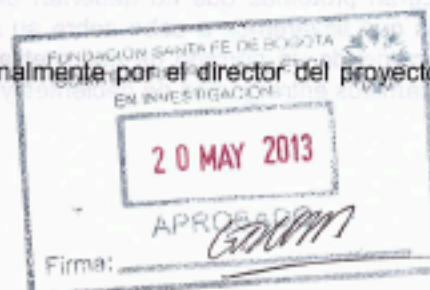
Usted puede tener acceso a la información que se recopile como parte del estudio solicitándola al grupo de investigación. Es posible que el director del proyecto le solicite durante el curso del estudio información adicional sobre usted o información familiar.

¿Tendré algún beneficio inmediato del resultado de estos análisis?

No, estos análisis se llevan a cabo como parte de una investigación y no proporcionan ningún beneficio económico; sin embargo, su participación servirá de ayuda para alcanzar nuevos conocimientos médicos y los resultados de este estudio aportarán conocimiento en la biología de la Diabetes.

¿Conoceré los resultados del estudio?

Si, los estudios serán dados a conocer personalmente por el director del proyecto una vez estén disponibles.



¿Podrá utilizarse la muestra almacenada en el Grupo de Genética para otros estudios?

Usted decide si desea que su muestra pueda ser utilizada en otros estudios del grupo de investigación. Es muy posible que la información que se logre obtener en éste estudio pueda complementarse en un futuro estudio con nuevas técnicas que en este momento no están contempladas. Además, su muestra podría servir de control en otros estudios donde no se estudie la Diabetes, lo cual permitiría agilizar otros estudios en los que no se cuente con el número adecuado de controles. Rellene con una X si está de acuerdo o no con los siguientes puntos:

1. Estoy de acuerdo con que mi muestra sirva para nuevos estudios del Laboratorio de Genética Humana dentro del proyecto de estudio de la Diabetes: [☐] Si, [☐] No.
2. Estoy de acuerdo con que mi muestra sirva para otros estudios del Laboratorio de Genética Humana no relacionados con Diabetes: [☐] Si, [☐] No.

Este proyecto fue revisado y aprobado por los Comités de Ética de la Universidad y de la Clínica que intervienen en el estudio, todos sus protocolos se ajustan a las leyes internacionales y a las disposiciones vigentes en Colombia según la Resolución No. 008430 de 1993, que establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

Para cualquier información adicional o inquietud sobre el proyecto usted puede contactar con los responsables del proyecto en el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de Los Andes o a través de un correo electrónico a las siguientes direcciones:

Dra. Helena groot de Restrepo: hgroot@uniandes.edu.co

Dr. Carlos Mendivil: cmendivi@uniandes.edu.co

Dr. Valeriano López: v.lopez22@uniandes.edu.co

En caso de usted como paciente considere violados sus derechos puede dirigirse al Comité Corporativo de Ética en Investigación (Fernando Sierra, Presidente). Calle 119 No. 7-75, Bogotá. Teléfono: 6030303 Ext.5402

Este estudio no supone ningún beneficio económico para los investigadores principales, pudiendo existir una ayuda económica para los estudiantes de Posgrado participantes en él.

He leído la información que contiene este formulario de consentimiento. He preguntado al personal todas las dudas que he tenido en este momento sobre mi participación en la investigación en la recolección de la muestra, y sobre la conservación de la muestra de sangre.

DILIGENCIAR EN EL ORDEN QUE APARECE

NOTA: ESTA SECCIÓN DEBE SER DILIGENCIADA SOLO POR EL VOLUNTARIO/A O POR EL TUTOR.

Nombre del Voluntario/a

Firma del Voluntario/a



VIII. RESULTADOS

8.1 EFECTO DEL CONTROL METABÓLICO EN LA METILACIÓN E HIDROXIMETILACIÓN DEL DNA EN T2DM

Para analizar los cambios epigenéticos causados por la diabetes, se cuantificaron los niveles de metilación y de hidroximetilación global en muestras de sangre periférica de pacientes con diabetes tipo 2 y controles sanos. A todas las muestras se les realizó un control del estado glucémico a través de la medición de los niveles de hemoglobina glucosilada (Hb1Ac), lo que permitió dividir a los pacientes en dos grupos: un grupo de pacientes con niveles de glucemia controlados, que se caracterizan por presentar un valor de Hb1Ac \leq 7 y un grupo de pacientes con un control metabólico deficiente, caracterizados por niveles de Hb1Ac \geq 7 (Ver tabla 24).

	Tamaño de muestra	Edad (años)	Tiempo de diagnóstico	Tabaco (# individuos)	Alcohol (# individuos)	Promedio de HbA1c (%)	Promedio de metilación del ADN - 5mC (ng y %)	Promedio de hidroximetilación del ADN-5hmC (ng y %)
Pacientes controlados	20	63.15	9.84	2	2	6.095	5.58595 % 1.836722 ng	0.1961727% 0.1993047ng
Pacientes no controlados	20	70.95	17.4	5	3	9.1585	4.052618 % 4.5201 ng	0.6977254 % 0.8758568 ng
Controles sanos	20	48.75	-	2	0	5.4775	1.53675 % 1.521305 ng	0.07938015% 0.07985741ng
Controles y pacientes controlados	20	55.95	-	7	2	5.78625	1.56135 % 1.679013 ng	0.1377764 % 0.1395811 ng

Tabla 24. Tabla característica de los grupos de análisis

Al comparar los niveles de metilación global entre el grupo de pacientes y los controles sanos no se obtuvieron diferencias significativas ($p=0.2204$)(Figura 29A). Sin embargo, se observa una tendencia a presentar niveles superiores de metilación en el grupo de pacientes, resultado contrario a lo que se esperaría de acuerdo con los datos conocidos en otros tejidos (Dhliwayo et al, 2014; Ding & Huang, 2014).

Teniendo en cuenta esta tendencia, se decidió separar y analizar a los pacientes según su estado metabólico, demostrando que el mal control metabólico está asociado con los cambios epigenéticos, provocando un aumento de metilación estadísticamente significativo frente a controles sanos y pacientes bien controlados (pacientes no controlados vs. controles sanos: $p=0.007331$; pacientes no controlados vs. controlados: $p=0.002915$)(Figura 29C). Igualmente ocurrió cuando se agruparon los controles sanos y los pacientes bien controlados en un solo grupo y se compararon con los pacientes pobremente controlados. Esta comparación dio como resultado una diferencia altamente significativa ($p<0.001$)(Figura 29E), lo que demuestra nuevamente que el control metabólico y los defectos oxidativos estarían en la base de los defectos epigenéticos detectados en la enfermedad y por lo tanto, un paciente bien controlado se comporta a este nivel como una persona sana, con todo lo que esto conlleva en el devenir de su enfermedad.

El estudio de los niveles globales de hidroximetilación fue aún más interesante. Aunque no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre pacientes y controles al igual que con los niveles de metilación, la tendencia a ser diferentes es clara con un valor $p=0.092$ (Figura 29B). Al comparar los tres grupos por separado, también se observó que la hidroximetilación de los pacientes controlados se asemeja al grupo control y ambos obtuvieron niveles de hidroximetilación estadísticamente menores que los pacientes no controlados (pacientes controlados vs. no controlados: $p=0.01217$, controles vs no controlados: $p=0.006715$) (Figura 29D). Igual que en la metilación, se analizó el grupo de controles sanos junto a los pacientes controlados frente a los pacientes no controlados, comparación que dio una diferencia significativa ($p=0.002326$) (Figura 29F), demostrando nuevamente que la falta de control glucémico, con sus niveles elevados de oxidación celular, es la base de los cambios hallados a nivel epigenético en esta enfermedad.

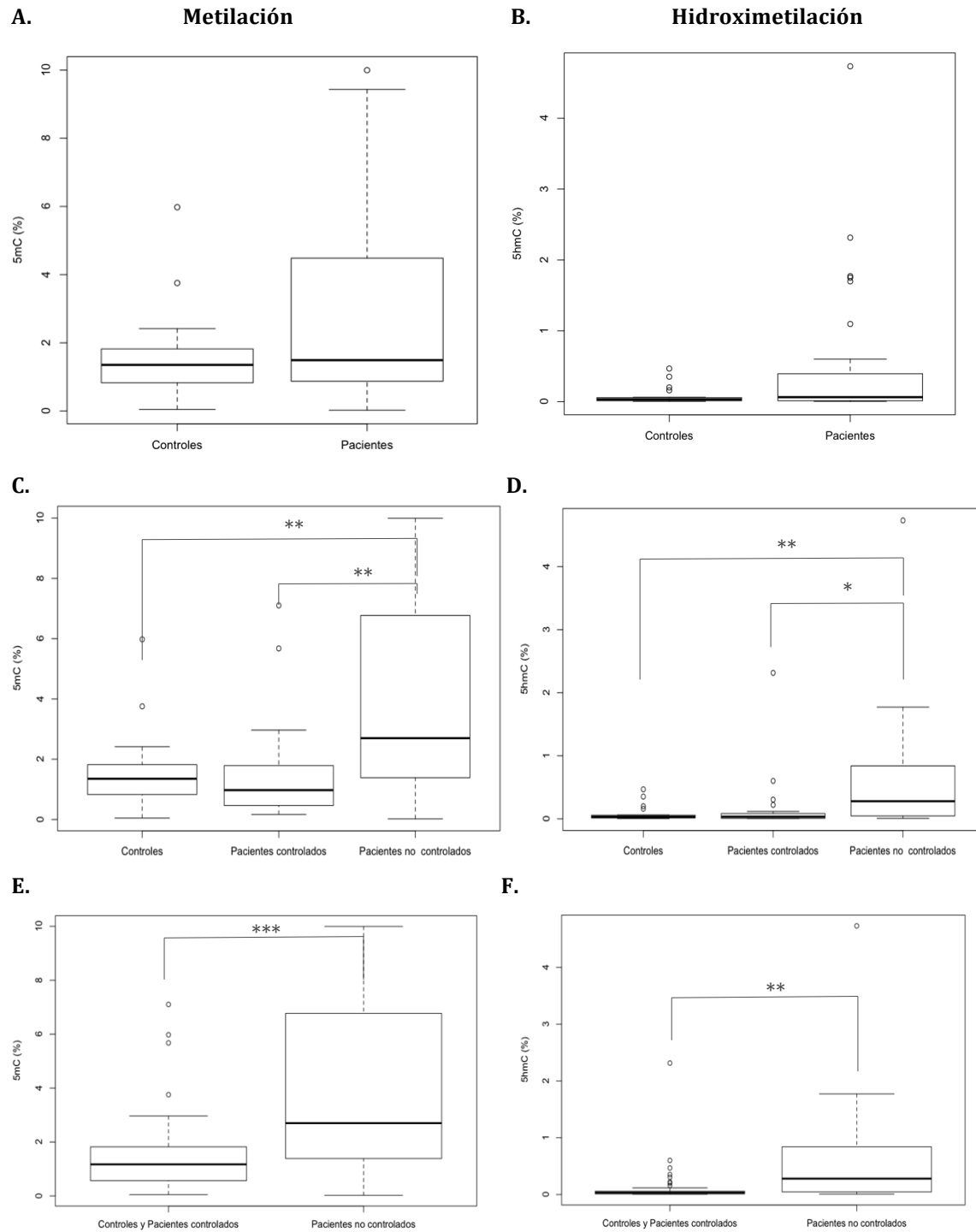
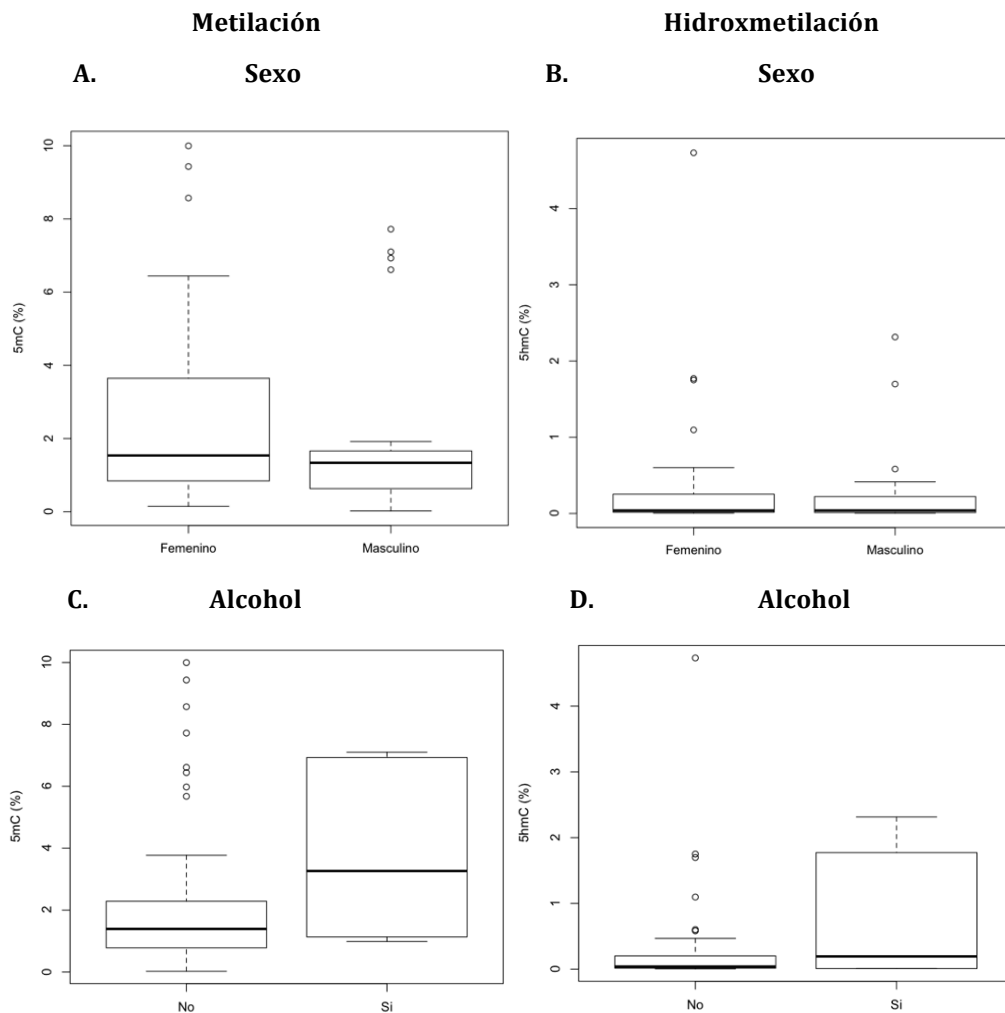


Figura 29. Porcentaje de la metilación en hidroximetilación global del DNA. A) Metilación global en controles sanos vs. pacientes, B) Hidroximetilación global en controles sanos vs pacientes, C) Metilación global en controles sanos, pacientes controlados y pacientes no controlados, D) Hidroximetilación entre controles sanos, pacientes controlados y pacientes no controlados, E) Metilación global en controles sano y pacientes controlados vs pacientes no controlados, F) Hidroximetilación entre controles sanos y pacientes controlados vs pacientes no controlados. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$.

8.2 SEXO Y FACTORES DE ESTILO DE VIDA

Según la Asociación Colombiana de Diabetes, se estima que las mujeres son mas propensas a padecer diabetes y es por esto que se decidió analizar el comportamiento según sexo. En los resultados según sexo se determinó que no existían diferencias significativas en los porcentajes globales de 5mC y 5hmC (5mC $p=0.2323$; 5hmC $p=0.5219$) (Figura 30A y 30B). Aunque si existe una tendencia al aumento de la metilación global en mujeres, probablemente por la forma como se distribuye la grasa en este sexo.

Estudios recientes han demostrado que el consumo de alcohol y tabaco inducen alteraciones epigenéticas (Bottiglieri et al., 2010, Nieratschker, Brata & Fallagatter, 2013). Se ha propuesto que el consumo de alcohol aumenta los niveles de homocisteína afectando la generación de SAM y el consumo de tabaco favorece al desarrollo del cancer. Por esto, se analizó el porcentaje de metilación e hidroximetilación global de los consumidores frente a los no consumidores. Respecto al consumo de alcohol y tabaco, tampoco hubo diferencias significativas entre consumidores de alcohol y no consumidores (5mC, $p=0.2622$; 5hmC, $p=0.7209$) (Figura 30C y 30D) o entre fumadores y no fumadores (5mC, $p=0.3049$; 5hmC, $p=0.3204$) (Figura 30E y 30F). Sin embargo, sí se observa una tendencia aumentada de metilación e hidroximetilación en las muestras de consumidores, lo cual resulta contrario a lo que se podría esperar.



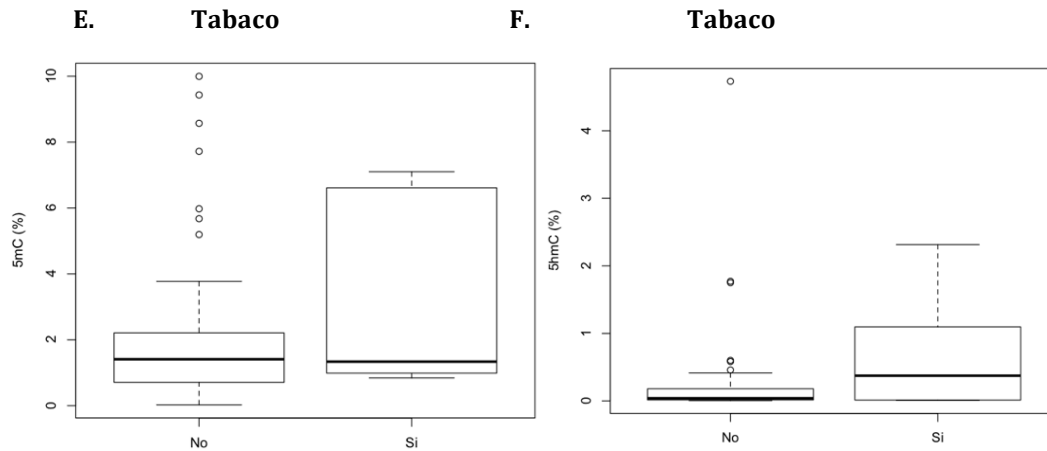
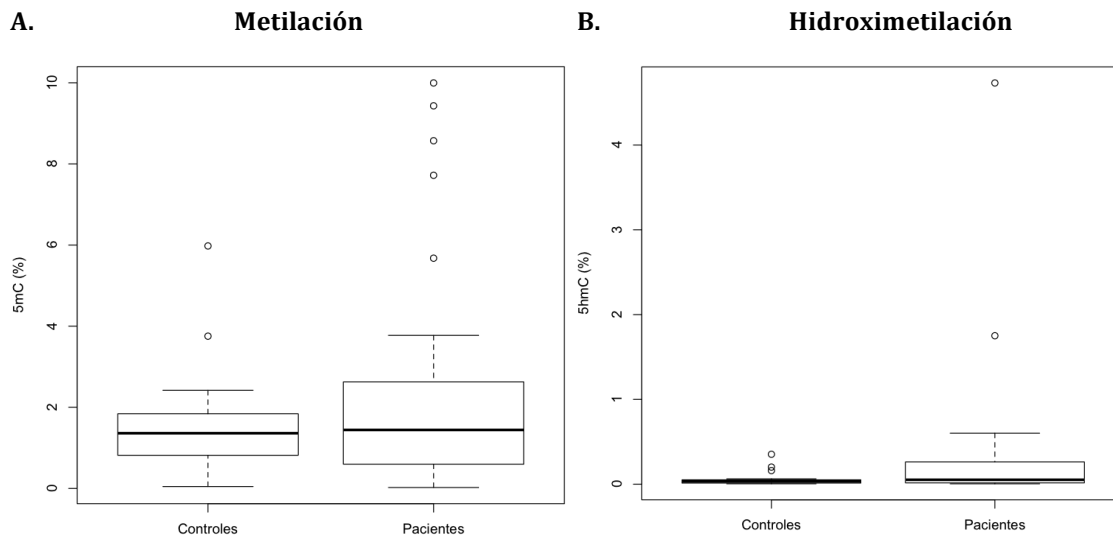


Figura 30. Diferencias en la metilación e hidroximetilación global del DNA. A y B) sexo, C y D) consumo de alcohol y E y F) consumo de tabaco.

De acuerdo a los estudios de alcohol y tabaco, decidimos eliminar los datos de individuos que consumían alcohol y tabaco y se realizó un análisis para evaluar los porcentajes de metilación e hidroximetilación que posiblemente estuvieran afectando los resultados. No se observó una diferencia significativa en la metilación e hidroximetilación al comparar los pacientes y controles ($p=0.6324$ y $p=0.09568$). Sin embargo, se observó una diferencia significativa en los tres grupos de tratamientos por separado para la metilación ($p=0.0048$) y para la hidroximetilación ($p=0.0056$). Igualmente al agrupar el grupo control con los pacientes controlados, se obtuvieron diferencias significativas para metilación ($p=0.01137$) e hidroximetilación (0.001939) (Figura 31).



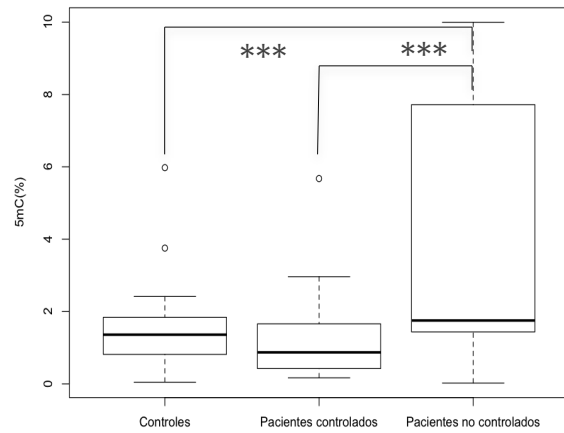
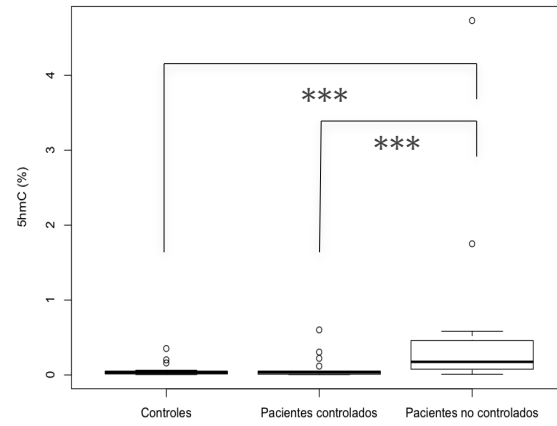
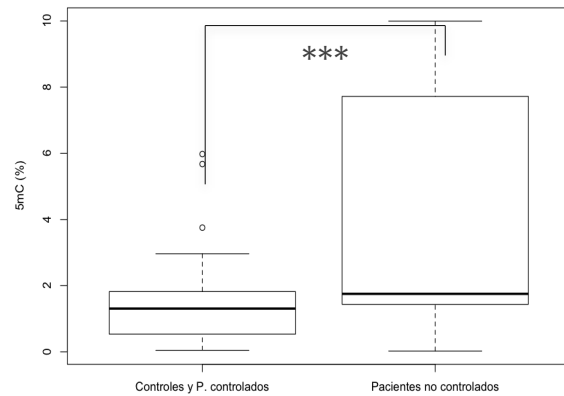
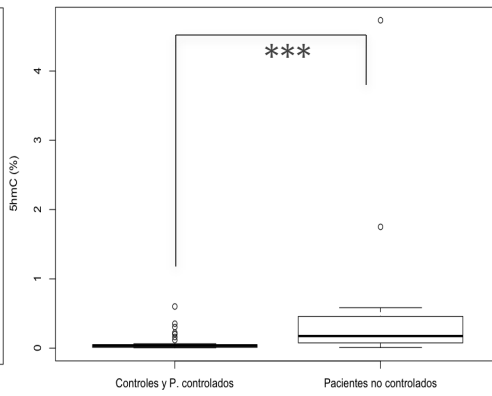
C.**D.****E.****F.**

Figura 31. Porcentaje de la metilación en hidroximetilación global del DNA, excluyendo datos de consumidores de alcohol y tabaco. A) Metilación global en controles sanos vs. pacientes, B) Hidroximetilación global en controles sanos vs. pacientes, C) Metilación global en controles sanos, pacientes controlados y pacientes no controlados, D) Hidroximetilación entre controles sanos, pacientes controlados y pacientes no controlados, E) Metilación global en controles sano y pacientes controlados vs. pacientes no controlados, F) Hidroximetilación entre controles sanos y pacientes controlados vs. pacientes no controlados. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$.

8.3 EDAD Y DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD

Debido a que la diabetes es una enfermedad crónica que empeora con el tiempo, es muy interesante conocer como se correlacionan los cambios epigenéticos estudiados con el tiempo de duración de la enfermedad y con la edad de los pacientes. Se sabe que el envejecimiento se asocia a cambios del metiloma en los individuos (Heyn, 2013) y se espera que en pacientes diabéticos no sea la excepción. Para este análisis (Figura 32) se realizó una correlación de Spearman buscando determinar si existía una tendencia en la metilación e hidroximetilación de DNA, según la edad y según el tiempo de diagnóstico de la enfermedad. No obstante, en este estudio no se encontró una correlación lineal entre la metilación del DNA y la edad ($r= 0.07665$, $p=0.07592$). En cuanto a la hidroximetilación, existe una tendencia, aunque no es estadísticamente significativa ($r=0.1065$, $p=0.06228$). A su vez, no se observó una correlación lineal entre la duración de la diabetes y los niveles de metilación e hidroximetilación del DNA (para 5mC $r=0.6131$ y $p=0.5284$; para 5hmC $r=0.3019$ y 0.3827).

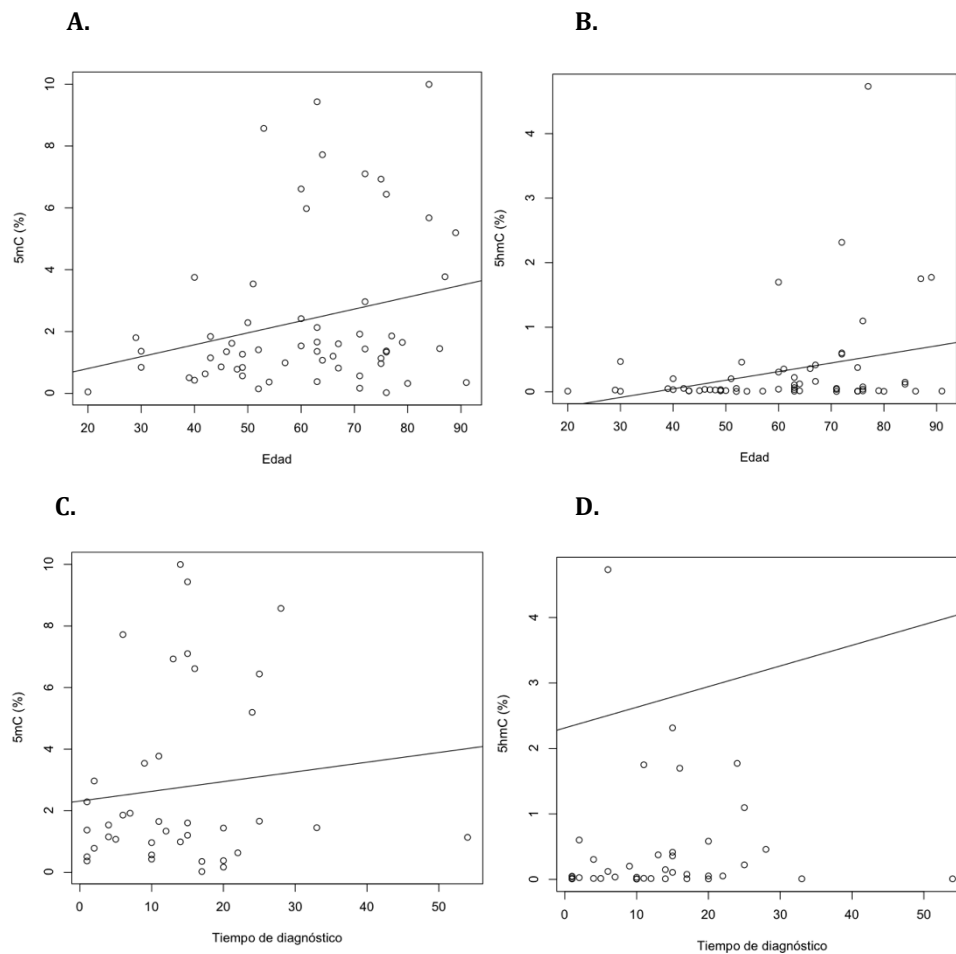


Figura 32. Correlación de los porcentajes de metilación e hidroximetilación entre la edad (A y B) y tiempo del diagnóstico (C y D).

8.4 qRT-PCR DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DESMETILACIÓN DEL DNA

Para estudiar la posible vía alterada en la metilación del DNA en sangre periférica, se realizó un ensayo de qRT-PCR para así determinar la cuantificación relativa de los fragmentos de *DNMT1* y *TET1*. El análisis de expresión de ambos fragmentos se realizó por separado para cada gen. La expresión de *DNMT1* ($p=0.9506$) y *TET1* ($P=0.5758$) se analizó en controles y pacientes por medio de la prueba de Wilcoxon y se determinó que no existen diferencias en la expresión según el control glucémico. Al analizar la expresión de *DNMT1* de los tres grupos por separado, controles, pacientes controlados y pacientes no controlados, con la prueba de Welch, tampoco se encontraron diferencias significativas en la expresión para *DNMT1* ($p=0.9756$) y *TET1* ($p=0.8047$).

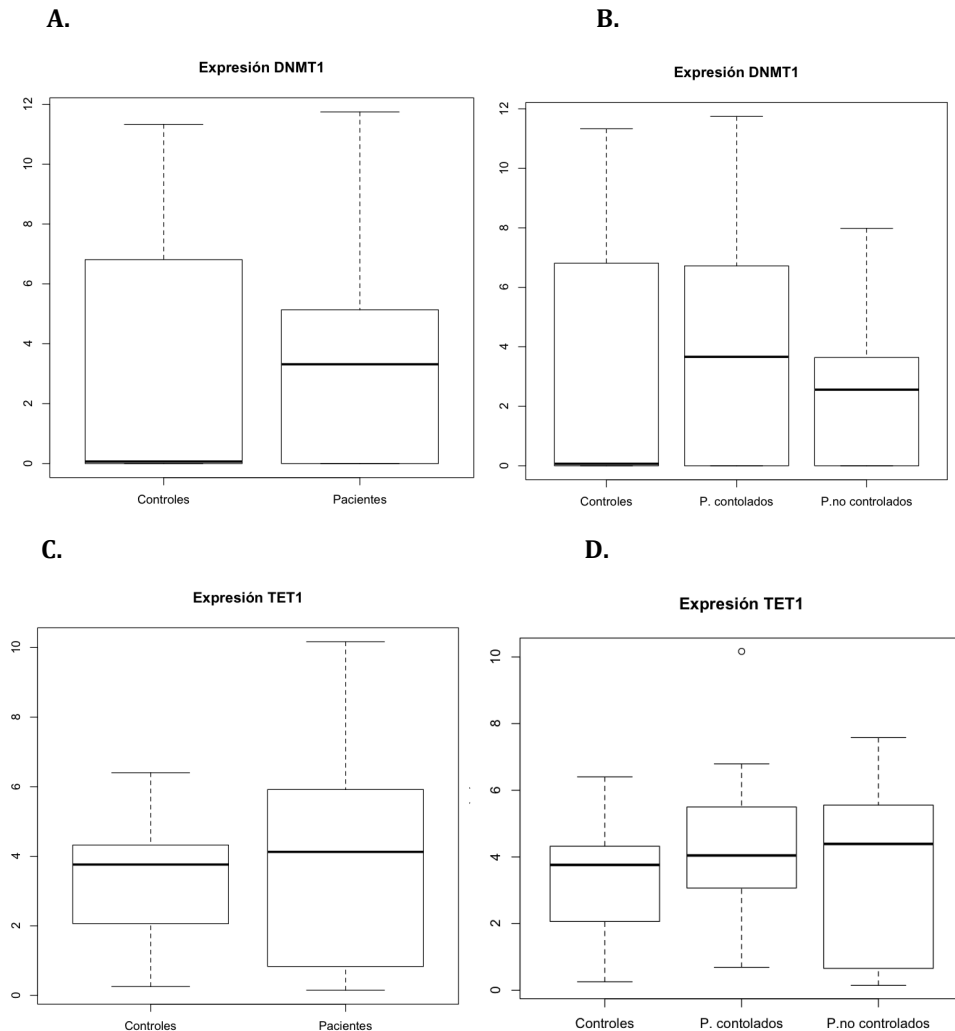


Figura 33. Expresión de genes *DNMT1* y *TET1* entre pacientes y controles. A) Expresión de *DNMT1* en el grupo control sano y pacientes. B) Expresión de *DNMT1* en controles sanos, pacientes controlados y pacientes no controlados. C) Expresión de *TET1* en el grupo control sano y pacientes. D) Expresión de *TET1* en controles sanos, pacientes controlados y pacientes no controlados.

8.5 ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS NIVELES DE METILACIÓN EN TEJIDOS AFECTADOS POR LA DIABETES

Teniendo en cuenta resultados limitados que ofrece trabajar con sangre periférica en esta enfermedad, se decidió llevar a cabo un estudio *in silico* con datos de metilación y expresión de microarreglos de diferentes tejidos afectados por la enfermedad. Para ello se analizaron un total de 416 microarreglos extraídos del repositorio Gene Expression Omnibus (GEO) del NCBI (Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res 2002; 30:207–10.).

De los microarreglos utilizados para analizar los niveles de metilación, se estudiaron muestras de sangre periférica de pacientes sin complicaciones, pacientes con nefropatías diabéticas y un grupo de controles sanos. Tomando los datos de la medida de MFI (Intensidad Media de Fluorescencia) se realizó una matriz de agrupamiento según individuos y genes. Para la clusterización de los datos se utilizó el programa Cluster 3.0 que forma grupos según los niveles de similitud. En este caso, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico y se visualizaron los resultados en el programa TreeView.

Los resultados obtenidos de la clusterización reflejan un agrupamiento claro entre pacientes y controles. (Figura 35A). En el análisis estadístico de sangre periférica se observó genes diferencialmente metilados entre los pacientes y el grupo control. Al analizar la metilación global de estos grupos se obtiene un resultado idéntico al encontrado en los experimentos previos, donde existe un aumento significativo de metilación en pacientes frente a los controles ($p=0.0000$) (Figura 34A).

Del mismo modo se analizaron microarreglos de metilación de otros tejidos de gran importancia en la diabetes, concretamente tejido adiposo, tejido muscular e islotes del páncreas, cada uno de los cuales se ve afectado de forma diferente. Mientras que en el caso del tejido adiposo y el tejido muscular no hubo diferencias significativas entre pacientes y controles, el páncreas mostró una hipometilación global en pacientes diabéticos frente al grupo control ($p=0.0007$), tal y como ha sido reportado en la literatura (Avrahami & Kaestner, 2012) (Figura 34C, D y E).

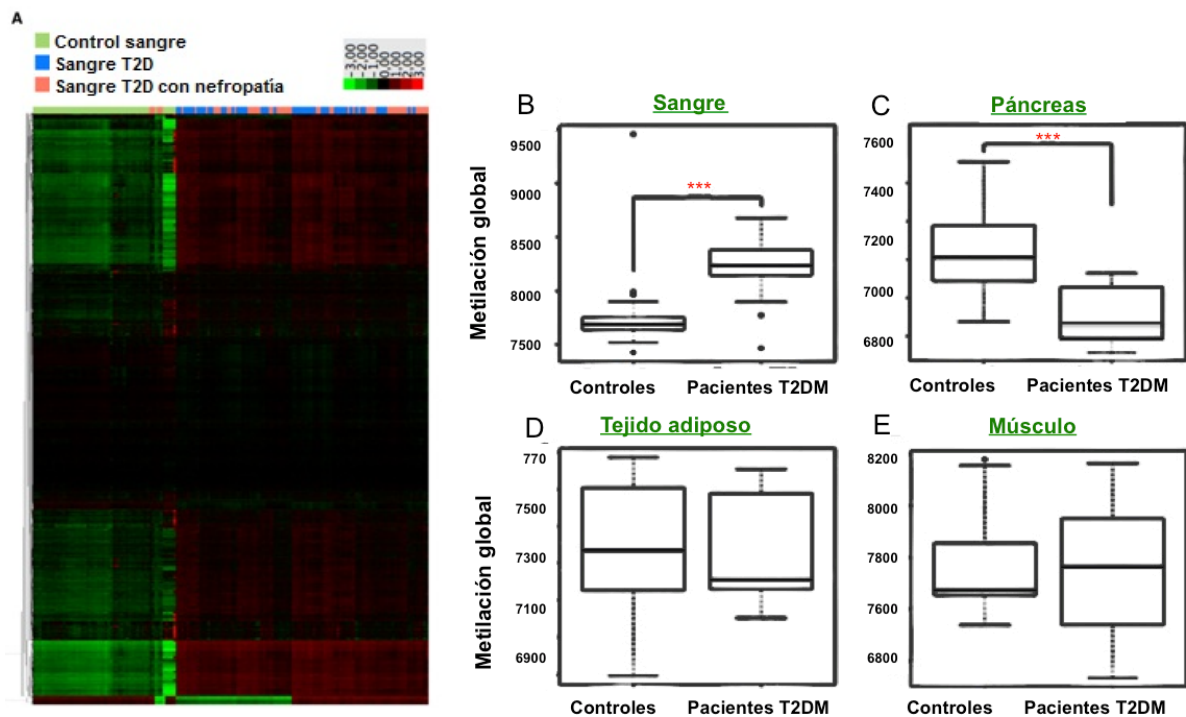


Figura 34. Análisis de microarreglos de sangre periférica en pacientes T2DM y un grupo control. A) Mapa de calor de muestras de sangre periférica de pacientes sin complicaciones, pacientes con nefropatías y controles sanos procedentes de 317 microarreglos desmetilación (Illumina Human Methylation 27 BeadChips). La escala se muestra en valores beta (relación de la intensidad de la sonda y la intensidad

global; la intensidad global es la suma de intensidad de la onda y no metilados; va desde 0 (no metilado, verde) a 1 (completamente metilado, rojo). B, C, D y E) Comparación de los niveles de metilación global en unidades IMF (Intensidad de fluorescencia media) entre los pacientes con T2DM y controles. Esto en tejido de sangre periférica, páncreas, tejido adiposo y muscular respectivamente. * = Valor de $p < 0,05$, ** = valor de $p < 0,01$, *** = valor de $p < 0,001$.

8.6 HIDROXIMETILACIÓN Y DIABETES: POSIBLES MECANISMOS DE DESMETILACIÓN

Considerando los resultados previos, se quiso conocer qué enzimas o vías podrían estar interviniendo en las alteraciones epigenéticas encontradas. Para ello se analizaron microarreglos de pacientes de T2DM y controles sanos en sangre periférica, islotes pancreáticos, tejido adiposo y músculo. Se escogieron varios genes de interés involucrados en las vías de desmetilación del DNA actualmente propuestas, y se estudió si sus cambios de expresión podrían explicar los cambios en los niveles de metilación e hidroximetilación encontrados previamente. Entre los genes analizados estuvieron las enzimas DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B Y UHRF1 por su papel en la vía de desmetilación pasiva, junto al regulador negativo de la DNMT1, miRNA-133a; las enzimas TET1, TET2 y TET3, por su papel en la hidroxilación de la 5mC, actualmente considerada la vía de desmetilación activa primordial; y por último, las enzimas de reparación AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3D, APOBEC4, por su función final en la desmetilación activa al eliminar las 5hmC y dar lugar a un DNA desmetilado.

El análisis estadístico para comparar los niveles de expresión diferencial de los genes candidatos en sangre periférica determinó que no existen diferencias que puedan explicar el aumento de la metilación y en el aumento de hidroximetilación entre los pacientes T2DM con glucemia no controlada, lo que resulta aún más importante, ya que no hay diferencias en los niveles de la enzima TET1, única de las TETs que pudo analizarse en los microarreglos de sangre periférica (Figura 35E).

Al analizar la expresión de las *DNMTs*, se encontraron diferencias en la expresión de *DNMT2* entre pacientes T2DM y el grupo control sano ($p = 0,031$, Figura 35B). Sin embargo, teniendo en cuenta la función de esta enzima, que está más asociada a la metilación del RNA y no a la del DNA y que la diferencia es por la disminución de la expresión, no parece ser que dicha enzima esté influenciando los cambios encontrados en la diabetes. El análisis del regulador negativo de la DNMT1, *miR-133*, no reveló cambios significativos en su expresión.

En cuanto a los genes involucrados en la reparación del DNA, se encontraron diferencias significativas en los genes *APOBEC3B* y *APOBEC3D* ($p=0.017$ y $p=0.042$, respectivamente) (Figuras 35K y 35L). El aumento de *APOBEC3B* en el grupo control sano y de *APOBEC3D* en pacientes diabéticos tampoco explica los cambios en la metilación y en una posible vía de desmetilación.

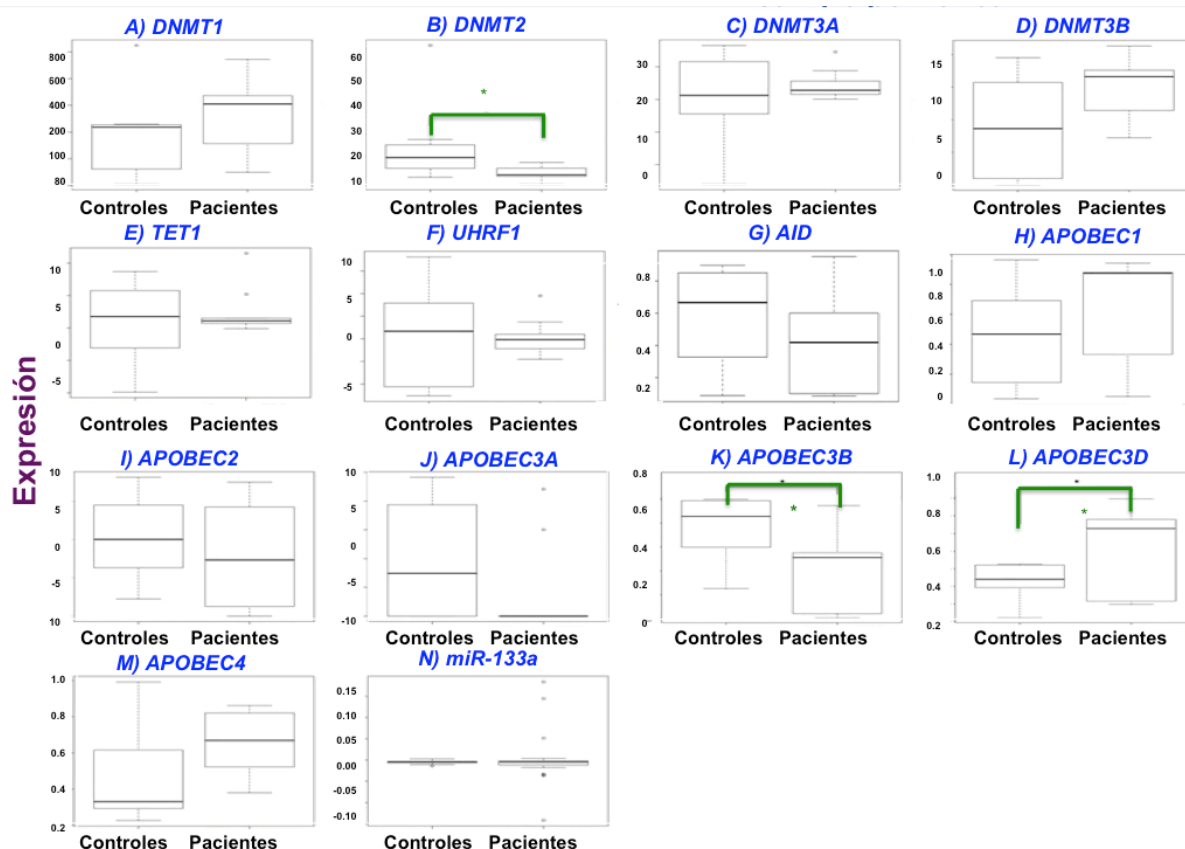


Figura 35. Análisis de la expresión diferencial de genes en sangre periférica de pacientes T2DM y el grupo control. A) *DNMT1*, B) *DNMT2*, C) *DNMT3A*, D) *DNMT3B*, E) *TET1*, F) *UHRF1*, G) *AID*, H) *APOBEC1*, I) *APOBEC2*, J) *APOBEC3A*, K) *APOBEC3B*, L) *APOBEC3D*, M) *APOBEC4*, N) *miR-133a*. *= p -value<0.05, **= p -value<0.01, ***= p -value<0.001.

Posteriormente, se evaluó la expresión diferencial de genes relacionados con la desmetilación del DNA en tejido pancreático (Figura 36). Para la desmetilación pasiva se evaluaron *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3B* y *UHRF1*; para la desmetilación activa se evaluaron los genes *TET1*, *TET2*, *TET3* y finalmente, los genes *AID*, *APOBEC1*, *APOBEC2*, *APOBEC3A*, *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G*, *APOBEC3H* y *CD*, involucrados en la reparación.

Al realizar los análisis estadísticos de las enzimas involucradas en la metilación del DNA, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de la *DNMT1* que pudieran explicar un posible mecanismo pasivo de desmetilación en los pacientes diabéticos. En el caso de la desmetilación activa, se observó una disminución en la expresión de *TET2* ($p=0.031$) en pacientes diabéticos, lo cual sería contrario al proceso observado de desmetilación y siendo insuficiente para explicarlo.

Uno de los datos más interesantes durante el estudio de este tejido fue comprobar cómo la enzima *AID* aparece sobreexpresada en pacientes frente a controles ($p=0.017$), algo que no sucede en el caso de la sangre periférica y que podría explicar por qué este tejido, en concreto, puede llegar a desmetilar las metilcitosinas previamente oxidadas por los altos niveles de ROS.



Figura 36. Análisis de expresión en tejido pancreático entre pacientes T2DM y el grupo control. A) *DNMT1*, B) *DNMT2*, C) *DNMT3A*, D) *DNMT3B*, E) *TET1*, F) *TET2*, G) *TET3*, H) *UHRF1*, I) *AID*, J) *APOBEC1*, K) *APOBEC2*, L) *APOBEC3A*, M) *APOBEC3C*, N) *APOBEC3D*, O) *APOBEC3F*, P) *APOBEC3G*, Q) *APOBEC3H*, R) *CD* (*Cytidine Deaminase*). *= p -value<0.05, **= p -value<0.01, ***= p -value<0.001.

Al realizar los análisis de expresión en tejido adiposo (Figura 37) y músculo esquelético (Figura 38) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los genes de interés. Posiblemente esto se debe a que dichas células son capaces de regular la entrada de glucosa y es así como se protegen de los daños aberrantes de la hiperglucemia.

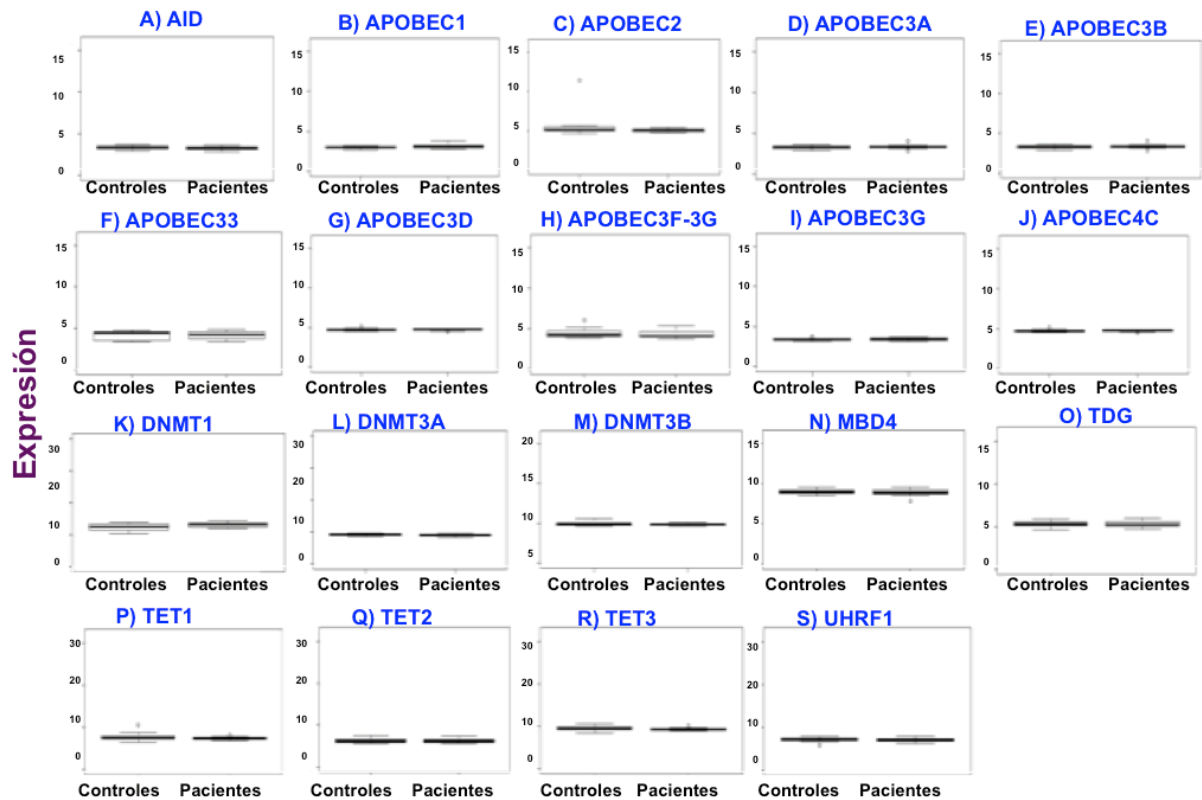


Figura 37. Análisis de expresión en tejido adiposo entre pacientes T2DM y el grupo control. A) *AID*, B) *APOBEC1*, C) *APOBEC2*, D) *APOBEC3A*, E) *APOBEC3B*, F) *APOBEC33*, G) *APOBEC3D*, H) *APOBEC3F-3G*, I) *APOBEC3G*, J) *APOBEC4C*, K) *DNMT1*, L) *DNMT3A*, M) *DNMT3B*, N) *MBD4*, O) *TDG*, P) *TET1*, Q) *TET2*, R) *TET3*, S) *UHRF1*. *=p-value<0.05, **=p-value<0.01, ***=p-value<0.001.

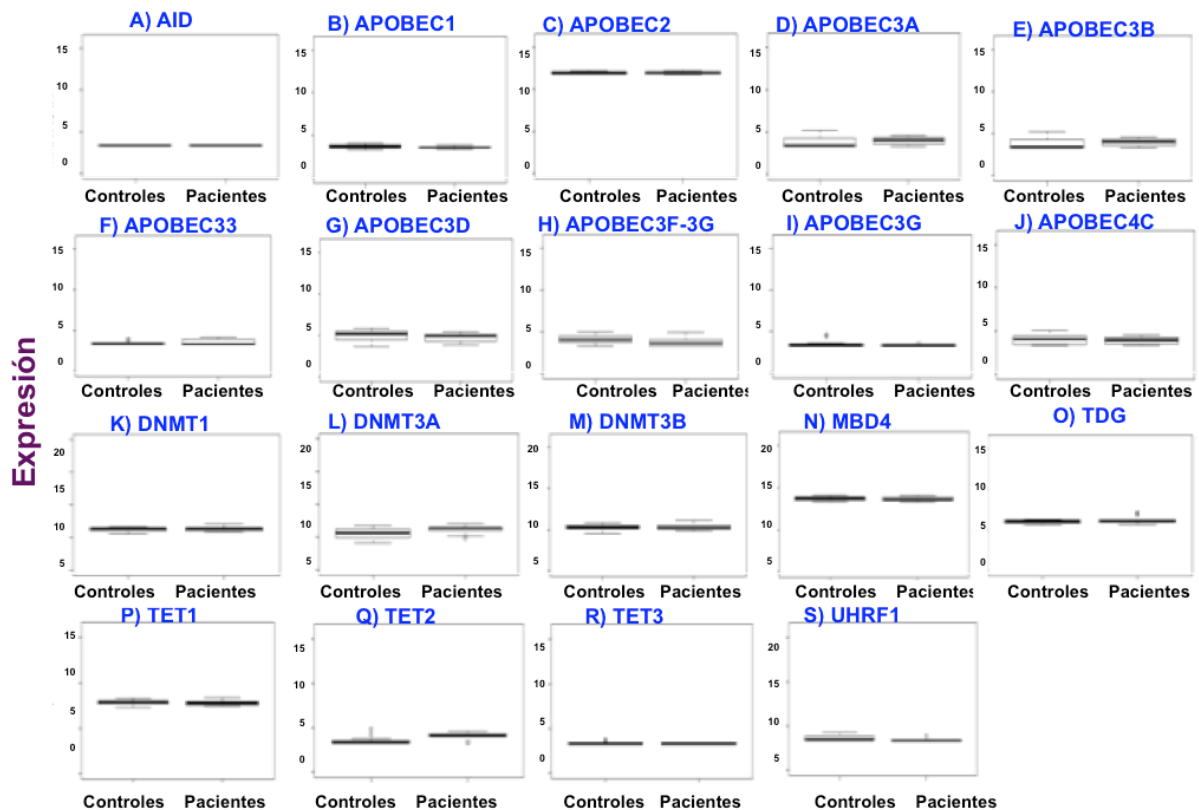


Figura 38. Análisis de expresión en tejido muscular entre pacientes T2DM y el grupo control. A) *AID*, B) *APOBEC1*, C) *APOBEC2*, D) *APOBEC3A*, E) *APOBEC3B*, F) *APOBEC33*, G) *APOBEC3D*, H) *APOBEC3F-3G*, I) *APOBEC3G*, J) *APOBEC4C*, K) *DNMT1*, L) *DNMT3A*, M) *DNMT3B*, N) *MBD4*, O) *TDG*, P) *TET1*, Q) *TET2*, R) *TET3*, S) *UHRF1*. *=p-value<0.05, **=p-value<0.01, ***=p-value<0.001.

8.7 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS

Utilizando el programa Chispter se analizó la expresión diferencial de genes en los microarreglos de tejido pancreático y sangre periférica. Se escogieron aproximadamente 50 genes y utilizando las bases de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) y Ensembl, se buscaron las rutas metabólicas en la que está involucrado cada gen diferencialmente expresado. Interesantemente, para el tejido pancreático se encontraron alteradas las vías asociadas al metabolismo de lípidos. Por otra parte, en sangre periférica las vías más afectadas son las de división celular, proteínas ribosomales y ubiquitin ligasas (Tabla 25).

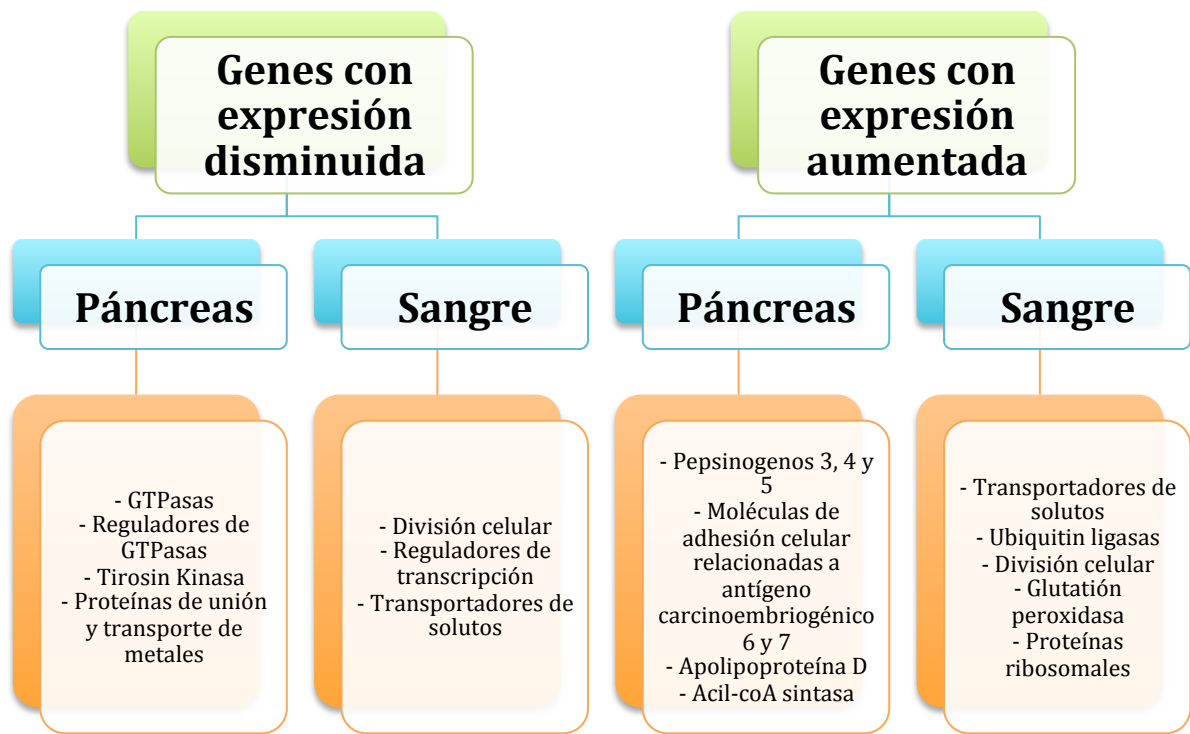


Tabla 25. Rutas afectadas en tejido pancreático y sangre periférica

9. DISCUSIÓN

9.1 EFECTO DEL CONTROL METABÓLICO EN LA METILACIÓN E HIDROXIMETILACIÓN DEL DNA EN T2DM

Los cambios epigenéticos asociados a enfermedades complejas están siendo ampliamente estudiados tras la confirmación de la importancia que su regulación tiene para la salud celular y fisiológica. Muchos de estas enfermedades, como la diabetes, el cáncer y enfermedades autoinmunes, inflamatorias y neurológicas, se han relacionado con defectos de desmetilación global del DNA, lo cual, a la larga, conduce a consecuencias desfavorables para la célula (Cooper & El-Osta, 2010; Rodríguez-Dorantes et al., 2004). Durante mucho tiempo no hubo claridad sobre los mecanismos de la desmetilación del DNA y hasta hace poco solo se aceptaba la desmetilación pasiva relacionada con la pérdida del grupo metilo tras la replicación del DNA. En 2009 se propuso una nueva vía activa la cual involucra enzimas que realizan un primer paso en la oxidación del metilo (Branco et al., 2011; Raiber et al., 2012). Gracias al aporte de estos dos estudios, en la actualidad se cuenta con la descripción de dos vías, activa y pasiva. Sin embargo, no existe explicación sobre cómo actúan estos mecanismos, debido a que las vías activas aún no se han caracterizado bajo condiciones patológicas, por ejemplo, en la diabetes. En el presente estudio se analizaron los cambios de los niveles de metilación del DNA en pacientes diabéticos frente a controles sanos con el fin de encontrar una explicación mecanística a dicho proceso.

El estudio de los niveles globales de metilación e hidroximetilación asociados a los niveles de control metabólico medidos a través de los porcentajes de Hb1Ac, han permitido demostrar que no es la diabetes *per se*, la causante de los cambios de metilación global. En el caso concreto de sangre periférica, encontramos una tendencia de aumento en la metilación e hidroximetilación global del DNA bajo condiciones patológicas. Unos de los hallazgos más sorprendentes fue la ausencia de diferencias entre la metilación y la hidroximetilación entre el grupo control sano y los pacientes controlados. Esto sugiere una relación directa con la hiperglucemia crónica y persistente que generan cambios acumulativos en el epigenoma. Esto hace referencia en particular a resultados de los estudios de la DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) y el estudio de la EDIC (*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*) (ver ANEXOS; 13.2.1 y 13.2.3), los cuales demuestran la importancia del control glucémico para prevenir las complicaciones a largo plazo y para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Específicamente, se encontró que los pacientes con un descontrol metabólico tendrán dramáticas repercusiones en el pronóstico de la enfermedad, provocando la disminución en la calidad de vida hasta la muerte. El estudio progresivo *San Antonio Heart Study*, aún en marcha, "*San Antonio Heart Study*", demostró que un incremento de la HbA1c de 5,5% a 9,5% produce patologías microvasculares importantes (Brownlee, 2005) y, por tanto, el buen control glucémico tendrá un efecto epigenético protector. Por otro lado, los cambios epigenéticos asociados al descontrol metabólico explican su rol de la memoria metabólica y su influencia en el desarrollo de las complicaciones diabéticas (Ceriello, 2008; Intine & Sarras, 2012).

Durante el análisis de nuestros resultados, observamos una mayor metilación en condiciones de diabetes, lo cual resulta contradictorio para la mayoría de estudios epigenéticos, en los cuales existe un proceso de desmetilación del DNA debido a los altos niveles de glucosa en la sangre (Giacco & Brownlee, 2010; A S Olsen, Sarras Jr., & Intine, 2010; Ansgar S. Olsen, Sarras, Leontovich, & Intine, 2012). En este caso, podemos establecer que la metilación del DNA es afectada por los estados metabólicos más que por la diabetes como tal. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que los patrones de metilación son tejido-específicos y cada uno reacciona de manera distinta según diferentes estímulos; mientras que en tejido endotelial la hipometilación parece dominar en la diabetes, en tejido sanguíneo resulta diferente (Heyn et al., 2013; A S Olsen et al., 2010; Ansgar S. Olsen et al., 2012).

Debido a su efecto sobre el estrés oxidativo, la disponibilidad de glucosa intracelular puede influir en la metilación por la vía de desmetilación. En este estudio proponemos que altos niveles de 5hmC en sangre se están dando por la oxidación celular generada por la hiperglucemia. Si bien, la falta de desmetilación

habría que explicarla por la falta de expresión en las enzimas de reparación implicadas en el proceso final de eliminación de metilos desde sus formas oxidadas.

Otra posible razón que puede explicar la falta de desmetilación en sangre es la dinámica propia del tejido, que cuenta con un alto nivel de recambio de células blancas en comparación con otros tejidos y que pueden estar enmascarando los resultados, aunque para demostrar esta conjetura se requiere nuevos estudios. Adicionalmente, debemos tener en cuenta que el tejido sanguíneo está conformado por distintas subpoblaciones de células que contienen diferentes perfiles de metilación y dinámicas respecto al uso de la glucosa y por tanto sería muy interesante poder llevar a cabo un estudio pormenorizado de los cambios en cada una de las estirpes celulares. La heterogeneidad del *pool* celular entre individuos puede tener un impacto en los estudios epigenéticos. El periodo de vida de estas células es de días, mientras que en otros tejidos como el páncreas, puede ser de años (Volkmar, Dedeurwaerder, Cunha, Ndlovu, Defrance, Deplus, Calonne, Volkmar, Igoillo-esteve, et al., 2012). La metilación global también puede ser alterada por los mismos procesos inmunológicos e inflamatorios propios de la diabetes, afectando los procesos epigenéticos del *pool*. A esto se le suman las condiciones medioambientales como el consumo de diferentes medicamentos para la diabetes, la información no proporcionada por los pacientes y controles, los malos hábitos de vida tales como el consumo de alcohol, tabaco y los excesos de la alimentación. Este último hábito genera picos glucémicos transitorios, los cuales afectan los patrones de metilación de manera permanente y generan la memoria metabólica (El-Osta et al., 2008; Ling & Groop, 2009).

El consumo de alcohol se ha asociado a niveles elevados de homocisteína que pueden contribuir a bajos niveles de SAM y baja capacidad de metilación. Esto se debe a que el alcohol afecta a varios intermediarios del metabolismo del ciclo de un carbono, al consumir los cofactores B12 y B6 importantes en la transferencia de ese carbono a SAM. (Bottiglieri et al., 2000; Iskandar et al., 2010; Nieratschker, Batra, & Fallgatter, 2013). Pacientes con alcoholismo crónico se han asociado con hipermetilaciones en sitios de restricción específicos para las enzimas HspII y MspI. Esto conduce a una disminución de la expresión de la DNMT3a y DNMT3b que finalmente conlleva a la hipometilación. A pesar de los diversos estudios del consumo de alcohol y tabaco que afectan los patrones de metilación celular, en este estudio no se pudo establecer su efecto en los pacientes diabéticos en sangre periférica, si bien, la eliminación de las muestras consumidoras permitió obtener datos mucho más robustos en las comparaciones, demostrando de forma indirecta que si están influyendo en las alteraciones epigenéticas encontradas.

9.2 EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN RUTAS DE DESMETILACIÓN

Al realizar el estudio de qRT-PCR para los genes de las enzimas DNMT1 y TET1 no encontramos diferencias en la expresión de estos dos importantes genes implicados en la desmetilación pasiva o activa. El mecanismo clásico de desmetilación está asociado a cambios epigenéticos en la desmetilación pasiva caracterizada por la acción de la DNMT1. diferentes estudios han propuesto que existe otra vía caracterizada por la oxidación enzimática de los grupos metilos por la familia TETs y la desaminación posterior de ellos (Branco et al., 2012). Como pudimos observar en nuestro estudio, las vías de desmetilación activa o pasiva, a nivel de estas dos enzimas, no están alteradas en caso de un pobre control glucémico. Se observó que la hidroximetilación está aumentada en pacientes con glucemia no controlada y que la TET1 no está sobreexpresada bajo la misma condición. No hubo diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes.

Años atrás, un importante estudio realizado en tejido muscular describió un mecanismo de protección por parte del tejido y la entrada excesiva de glucosa. Se ha visto que el tejido no genera resistencia a la insulina aún bajo altos niveles de glucosa en sangre debido a una menor expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en células no afectadas por la diabetes (Dimitrakoudis, Ramlal, Rastogi, Vranic, & Klip, 1992; Klip et al., 1992; Marette et al., 1999). Este transportador es crítico para permitir la entrada de glucosa; células

como las endoteliales, de retina, de Shawn, neuronas y células de glomérulo, que no son capaces de regular la expresión de *GLUT4*, son afectadas en caso de esta enfermedad. Permitir el exceso de entrada de glucosa en la célula genera altos niveles de oxidación, de esta manera se afectan las vías bioquímicas que conllevan a las complicaciones (Brownlee, 2005). Por todo ello, postulamos la existencia de una nueva vía de desmetilación alterna a las ya descritas; una vía que oxida directamente a los grupos metilos en el DNA debido a la desregulación en los estados de oxidación celular por la entrada excesiva de glucosa.

9.3 UN POSIBLE MECANISMO NUEVO DE DESMETILACIÓN EN ESTADOS DE ENFERMEDAD

Para comparar los resultados moleculares obtenidos previamente, se realizó un estudio de microarreglos *in silico* con el objeto de demostrar que la metilación es tejido-específico y que los resultados obtenidos en sangre concuerdan con los de los microarreglos. El análisis de microarreglos de metilación para sangre periférica de pacientes, pacientes con nefropatías y controles, confirmó que la sangre es un tejido en el que hay una hipermetilación del DNA, frente a lo que se esperaba, *a priori*, en diabetes. Además, los resultados de clusterización muestran que sin tener en cuenta el estado de control metabólico, dato con el que no contamos para los microarreglos, no existen diferencias en la gravedad de la enfermedad a nivel epigenético. Por tanto, la presencia de complicaciones y los niveles altos de metilación son independientes. Solo el buen control glucémico podría revertir este cambio y posiblemente, detener el deterioro provocado por la enfermedad.

A diferencia de la sangre, el tejido pancreático sí presenta hipometilación global del DNA. Con el resultado de que ambos tejidos responden a altos niveles de glucosa circulante, el interrogante que nos quedaba por resolver era conocer qué mecanismo subyace al proceso degenerativo que provoca el aumento de hidroximetilcitosinas en sangre, y muy posiblemente en el páncreas, y por qué, a pesar de ese aumento, la sangre no termina por desmetilarse, a diferencia de lo que ocurre en tejido pancreático. Como era de esperar, no encontramos diferencias en la metilación global de tejido adiposo y muscular, ya que son tejidos que controlan mucho la entrada de glucosa y por tanto no se encuentran bajo el efecto oxidativo de la hiperglucemia.

A través de microarreglos de expresión se analizaron enzimas involucradas en las vías de desmetilación tanto activa como pasiva en sangre periférica y en tejido pancreático, en el cual se determinó que no hay diferencias en la expresión de enzimas que pudieran explicar los cambios en las modificaciones. En el caso del tejido sanguíneo, no se encontró alteración en la expresión de *DNMT1* y *UHRF1*, que pudieran explicar el aumento en la metilación en el caso de pacientes; tampoco se observó la presencia significativa del regulador negativo de la DNMT1, el *miRNA133a*. Se observó un aumento significativo de la DNMT2 en los controles, pero esto no explica la metilación en pacientes y tampoco es relevante ya que se relaciona principalmente con la metilación del RNA. Las enzimas TETs tampoco explican el aumento de hidroximetilos en los pacientes, motivo por el cual nuevamente nos preguntamos cómo está ocurriendo la oxidación. En el caso del tejido pancreático, no se encontraron diferencias en estas mismas enzimas, excepto en TET2 que está aumentada en los controles. Esto resulta contradictorio frente a los mismos resultados de que en el páncreas existe una hipometilación global, en caso de diabetes.

La falta de cambios entre pacientes y controles en ambos tejidos parecen indicar que los procesos de oxidación a hidroximetilcitosinas que se dan en sangre y la desmetilación comprobada en el páncreas, no pueden ser debidos a las vías actualmente establecidas. Solamente pueden explicar el proceso los niveles aumentados de oxidación demostrados en diabetes, asociados a los altos niveles de hemoglobina glicosilada demostrados en pacientes mal controlados. De este modo, proponemos un primer proceso de oxidación no enzimático de las 5-metilcitosinas que daría lugar a un aumento de 5hmC, tal como se encuentra en sangre periférica.

A diferencia de lo que ocurre en el páncreas, el hecho de que la sangre no termine por demetilarse puede ser debido, como se explicó anteriormente, a la propia dinámica de este tejido. Sin embargo, los datos de los microarreglos de expresión permiten intuir que el mantenimiento de la metilación en sangre puede ser ayudado por la falta de maquinaria que repare las 5hmC a citosinas convencionales. Entre esta maquinaria, en los últimos años, se ha propuesto un importante papel a las enzimas APOBECs y a AID. Las pequeñas diferencias de APOBEC3B y APOBEC3D encontradas en sangre no pueden explicar los resultados. La APOBEC3B disminuida en pacientes podría explicar la falta de desmetilación en caso de diabetes, que no termina por desmetilarse, aunque se necesitan más estudios para corroborar la vía. Por otro lado, la APOBEC3D no explica el aumento de metilación en pacientes y, por consecuencia, no es la causa de la desregulación epigenética.

El dato clave de nuestro estudio fue encontrar un aumento de AID en el tejido pancreático de pacientes, ya que esto indica una posible vía de desmetilación que se asocia con los altos niveles de 5hmC que termina en la desmetilación global del genoma. La sobreexpresión de esta enzima en el páncreas podría ser la razón del aumento de 5hmC provocado por la oxidación celular generada por la glucosa, en la que terminan convertidas en citosinas convencionales y, dando lugar a un genoma desmetilado. Por su parte, la falta o menor expresión de AID en sangre, restringida seguramente a su función sobre los genes de las inmunoglobulinas y TCRs de los linfocitos, podría explicar por qué en sangre periférica se mantiene la metilación, a pesar de los altos niveles de hidroximetilcitosinas existentes en pacientes diabéticos. Además del papel principal de AID, se requiere un estudio de los mecanismos antioxidantes, como los de las enzimas SODs y GSTs y los de las enzimas encargadas en la reparación BER, y aquellas que dependen de la TDG y MBD4, cuyo papel también ha sido descrito como crítico para el proceso de desmetilación.

En este estudio proponemos un mecanismo de desmetilación distinto a lo que se ha descrito hasta ahora. Un mecanismo que explica la hipometilación en la diabetes y en otras condiciones patológicas, independiente de enzimas, hoy en día caracterizadas en catalizar la primera reacción de oxidación del 5mC, concretamente independiente de TETs. Este nuevo mecanismo de desmetilación se basa en la desregulación de los estados redox celular de la célula que propone una oxidación directa por parte de ROS a los grupos metilos del DNA (Figura 40). En la actualidad se ha descrito la manera cómo afecta los estados de oxidación al DNA, y por qué no esta misma vía podría ser la causante de la oxidación de los metilos. De este modo, el ambiente oxidante típico de la diabetes y de los procesos proinflamatorios, también presentes en enfermedades complejas como el cáncer y ciertas enfermedades autoinmunes, provocarían esta primera oxidación de los 5-metilos a 5-hidroxiolos. Posteriormente estas 5hmC se repararían por medio de AID o por TDG para terminar dando un genoma hipometilado.

Es evidente que el mecanismo oxidativo puede ser la causa de muchas de las alteraciones epigenéticas en la diabetes. A la vez, es necesario tener en cuenta la predisposición genética de cada individuo, los trastornos genéticos y bioquímicos de la maquinaria enzimática involucrada en este metabolismo, las condiciones medioambientales y los hábitos de vida, como el consumo de sustancias alucinógenas, tabaco, medicamentos, alimentación y ejercicio. Todos estos factores afectan el epigenoma y la forma como se expresan muchos genes involucrados en la diabetes.

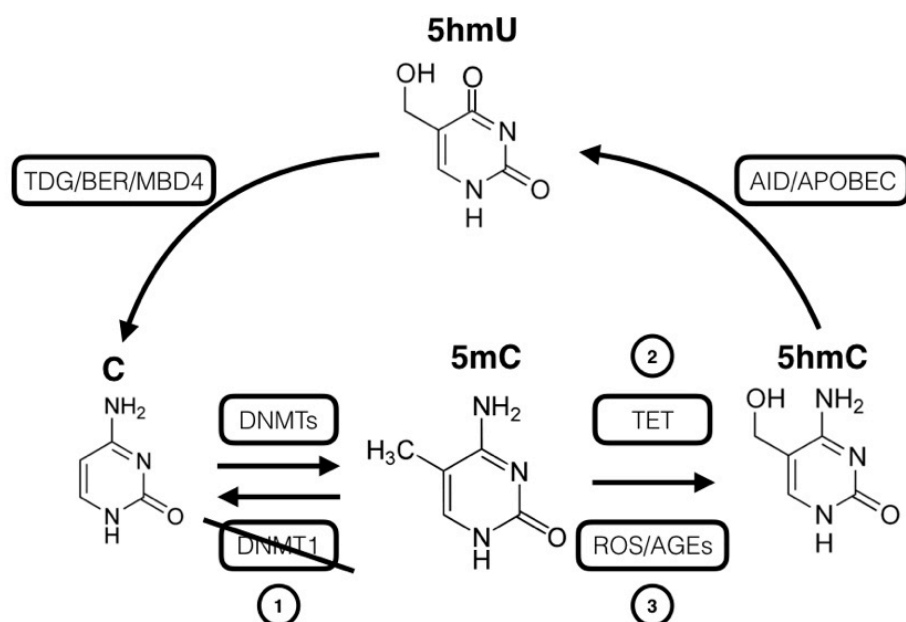


Figura 39: Representación esquemática de las posibles vías de desmetilación del DNA. 1) Vía de desmetilación pasiva. Deficiencia de la función de DNMT1 causa falta en el mantenimiento de las metilaciones durante la división celular. **2)** Desmetilación enzimática activa. Las TETs producen 5hmC, que luego es desaminada a 5mC por el complejo AID o APOBEC. Esta base es retirada por el sistema de reparación por escisión de base de DNA (BER), por la glicosilasa de timina o por MBD4, la proteína de unión a mCpGs. **3)** Desmetilación activa no enzimática. Vía nueva propuesta, un aumento en ROS y AGEs genera oxidación directa y espontánea del 5mC, generando 5hmC y su posterior eliminación.

9.4 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS Y SU EFECTO SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Por último, teniendo en cuenta los genes diferencialmente expresados bajo condiciones patológicas, pudimos encontrar las posibles vías metabólicas desreguladas en los tejidos pancreático y sanguíneo. Al analizar los genes pobremente expresados del páncreas, pudimos determinar que se alteraron vías de señalización como GTPasas y sus reguladores, tirosin-quinasas, proteínas de unión y de transporte de metales y se sobreexpresaron genes como pepsinogeno 3, 4 y 5, moléculas de adhesión relacionada con el antígeno carcinoembrionario, Acil-coA sintasa y apolipoproteína D. Estas desregulaciones se correlacionan con vías que conllevan a la tumorigénesis y, en consecuencia, la alta susceptibilidad que tienen los pacientes a padecer cáncer.

En el caso de sangre, encontramos genes pobremente regulados como genes involucrados en la división celular, genes de reguladores de transcripción y genes de transportadores de soluto. También encontramos genes altamente expresados, asociados a la degradación de proteínas, enzimas antioxidantes y genes de detoxificación, como la glutatión peroxidasa. Esto hace énfasis en la sobreexpresión de esta proteína en diabéticos, con el fin de neutralizar los radicales libres, indicándonos que, a pesar de no encontrar diferencias en patrones de metilación global en nuestro estudio, el tejido sanguíneo sí está siendo afectado por los estados hiperglucémicos. También se encuentran desregulaciones en proteínas encargadas de transporte, degradación y división celular que pueden llegar a relacionarse con otras patologías como las leucemias.

Por ultimo, este estudio en pacientes diabéticos es un primer paso para conocer y caracterizar las vías involucradas en la generación de sus complicaciones y la manera como es afectada por memoria metabólica. Esta ultima, puede ser explicada como un efecto de la desregulación epigenética y por lo tanto, la caracterización epigenética de la patología puede tener beneficios sobre el tratamiento para los pacientes con diabetes. Todos los resultados obtenidos se corresponden con la hipótesis de partida y por ello apoyan la idea de la existencia de una nueva vía de desmetilación iniciada en condiciones patológicas y mediada por los altos niveles de estrés oxidativo. Una nueva vía que prescinde de la familia TET, actualmente consideradas imprescindibles para el proceso de desmetilación activa, y que explicaría los procesos de hipometilación encontrados en muchas enfermedades complejas a través de un proceso de oxidación espontanea de las 5mC a 5hmC por efecto de los niveles de ROS.

X. CONCLUSIONES

1. Los niveles de 5mC y 5hmC en sangre son afectados por el control glucémico y no por la Diabetes per se.
 - La metilación en sangre es mayor en pacientes no controlados y esto se corroboró con el estudio de microarreglos *in silico*.
2. La maquinaria descrita hoy en día no explica el proceso metilación del DNA bajo condiciones patológicas.
 - La expresión en los niveles de las enzimas no explican los cambios obtenidos en sangre.
3. El análisis en sangre de expresión diferencial *in silico* tampoco demostró genes diferencialmente expresados en caso de diabetes, que pudieran explicar la desregulación de esta patología.
4. Es por esto, se propone una vía alterna de desmetilación, basada un proceso de oxidación no enzimático.
5. Existen varias vías de regulación alteradas en diabetes, tanto en páncreas, como en sangre. Muchos de los genes alterados están relacionados con las complicaciones de la diabetes.

XI. RECOMENDACIONES

- ✓ Es importante ampliar el presente estudio con análisis *in vitro* de tejidos que se afectan diferencialmente por la hiperglucemia para comprobar el efecto de las enzimas sobre los mecanismos de metilación y desmetilación.
- ✓ Sería interesante realizar un estudio de MedChip por su alta especificidad y sensibilidad, para evaluar zonas específicas que se metilan o desmetilan durante los estados hiperglucémicos, lo que permitirá comparar los resultados con las vías metabólicas afectadas.
- ✓ Para obtener resultados más predictivos, sería de gran utilidad ampliar el número de individuos evaluados con el fin de eliminar posibles sesgos de confusión en el estudio.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Aschner, P. (2010). Epidemiología de la diabetes en Colombia. *Av. Diabetol.*, 26, 95–100.
[http://doi.org/10.1016/S1134-3230\(10\)62005-4](http://doi.org/10.1016/S1134-3230(10)62005-4)
- Atkinson, M. a., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(13), 69–82.
[http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Avrahami, D., & Kaestner, K. H. (2012). Epigenetic regulation of pancreas development and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(6), 693–700.
<http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.06.002>
- Bashir Aamir, U., Badar, N., Mehmood, M. R., Nisar, N., Suleman, R. M., Shaukat, S., ... Klimov, A. (2012). Molecular epidemiology of influenza A(H1N1)pdm09 viruses from Pakistan in 2009-2010. *PLoS ONE*, 7(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0041866>
- Bhutani, N., Burns, D. M., & Blau, H. M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell*, 146(6), 866–872.
<http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.042>
- Bottiglieri, T., Laundy, M., Crellin, R., Toone, B. K., Carney, M. W. P., Reynolds, E. H., & Hospital, P. (2000). monoamine metabolism in depression, 228–232.
- Branco, M. R., Ficiz, G., & Reik, W. (2011). Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nature Reviews Genetics*, 13(1), 7–13. <http://doi.org/10.1038/nrg3080>
- Brownlee, M. (2005a). The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*, 54(June 2005), 1615.
<http://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
- Brownlee, M. (2005b). The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*, 54(June), 1615.
<http://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
- Caudill, M. A., Wang, J. C., Melnyk, S., Pogribny, I. P., Jernigan, S., Collins, M. D., ... James, S. J. (2001). Biochemical and Molecular Action of Nutrients Intracellular S-Adenosylhomocysteine Concentrations Predict Global DNA Hypomethylation in Tissues of Methyl-Deficient Cystathionine β -Synthase Heterozygous Mice 1, (May), 2811–2818.
- Ceriello, A. (2008a). La “memoria metabólica” inducida por la hiperglucemia: el nuevo reto en la prevención de la enfermedad cardiovascular en la diabetes. *Rev Esp Cardiol*, 8, 12–8. Retrieved from <http://www.revespcardiol.org/es/linksolver/ft/id/13119904>
- Ceriello, A. (2008b). La “memoria metabólica” inducida por la hiperglucemia: el nuevo reto en la prevención de la enfermedad cardiovascular en la diabetes. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 8, 12C–18C. [http://doi.org/10.1016/S1131-3587\(08\)73550-7](http://doi.org/10.1016/S1131-3587(08)73550-7)
- Chatterjee, R., & Vinson, C. (2013). NIH Public Access, 1819(7), 763–770.
<http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.02.014.CpG>
- Chen, C. C., Wang, K. Y., & Shen, C. K. J. (2013). DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9084–9091.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M112.445585>
- Chen, Z., & Riggs, A. D. (2011). DNA methylation and demethylation in mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18347–53. <http://doi.org/10.1074/jbc.R110.205286>
- Cooper, M. E., & El-Osta, A. (2010). Epigenetics: Mechanisms and implications for diabetic complications. *Circulation Research*, 107, 1403–1413. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223552>
- Denis, H., Ndlovu, M. N., & Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Reports*, 12(7), 647–656. <http://doi.org/10.1038/embor.2011.110>
- Dhliwayo, N., Sarras, M. P., Luczkowski, E., Mason, S. M., & Intine, R. V. (2014). Parp inhibition prevents ten-eleven translocase enzyme activation and hyperglycemia-induced DNA demethylation. *Diabetes*, 63(9), 3069–3076. <http://doi.org/10.2337/db13-1916>
- Diabetes, N., & Clearinghouse, I. (1993). DCCT and EDIC :

- Dimitrakoudis, D., Ramlal, T., Rastogi, S., Vranic, M., & Klip, a. (1992). Glycaemia regulates the glucose transporter number in the plasma membrane of rat skeletal muscle. *The Biochemical Journal*, 284 (Pt 2, 341–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1132643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ding, G.-L., & Huang, H.-F. (2014). Role for Tet in Hyperglycemia-Induced Demethylation: A Novel Mechanism of Diabetic Metabolic Memory. *Diabetes*, 63(9), 2906–2908. <http://doi.org/10.2337/db14-0675>
- Drzewoski, J., Kasznicki, J., & Trojanowski, Z. (2009). The role of “metabolic memory” in the natural history of diabetes mellitus. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 119(7-8), 493–500. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19776690&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/uuid/57906FCA-6EB0-4D6B-A6DC-3722E9385AE5>
- El-Osta, A., Brasacchio, D., Yao, D., Poci, A., Jones, P. L., Roeder, R. G., ... Brownlee, M. (2008). Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(10), 2409–2417. <http://doi.org/10.1084/jem.20081188>
- Felsenfeld, G. (2014). A brief history of epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a018200>
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications, 137–188. <http://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011>
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010a). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107, 1058–1070. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010b). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9), 1058–1070. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, 128(4), 635–638. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>
- He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., ... Xu, G.-L. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 333(2011), 1303–1307. <http://doi.org/10.1126/science.1210944>
- Heyn, H., Moran, S., Hernando-herraez, I., Sayols, S., Gomez, A., Sandoval, J., ... Esteller, M. (2013). DNA methylation contributes to natural human variation, 1–11. <http://doi.org/10.1101/gr.154187.112.Freely>
- Holliday, R. (2006). Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics*, 1(2), 76–80. <http://doi.org/10.4161/epi.1.2.2762>
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 14, R115. <http://doi.org/10.1186/gb-2013-14-10-r115>
- Illingworth, R. S., & Bird, A. P. (2009). CpG islands - “A rough guide.” *FEBS Letters*, 583(11), 1713–1720. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>
- Intine, R. V., & Sarras, M. P. (2012). Metabolic memory and chronic diabetes complications: Potential role for epigenetic mechanisms. *Current Diabetes Reports*, 12, 551–559. <http://doi.org/10.1007/s11892-012-0302-7>
- Iskandar, B. J., Rizk, E., Meier, B., Hariharan, N., Bottiglieri, T., Finnell, R. H., ... Hogan, K. J. (2010). Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1603–1616. <http://doi.org/10.1172/JCI40000>
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33 Suppl(march), 245–254. <http://doi.org/10.1038/ng1089>
- Jin, S. G., Kadam, S., & Pfeifer, G. P. (2010). Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucleic Acids Research*, 38, 1–7.

<http://doi.org/10.1093/nar/gkq223>

- Jones, P. a. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484–492. <http://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Klip, A., Marette, A., Dimitrakoudis, D., Ramlal, T., Giacca, A., Shi, Z. Q., & Vranic, M. (1992). Effect of diabetes on glucoregulation. From glucose transporters to glucose metabolism in vivo. *Diabetes Care*, 15(11), 1747–1766. <http://doi.org/10.2337/diacare.15.11.1747>
- Laurent, L., Wong, E., Li, G., Hodges, E., Smith, A. D., Kendall, J., ... Sung, K. (2010). Dynamic changes in the human methylome during differentiation Dynamic changes in the human methylome during differentiation, 320–331. <http://doi.org/10.1101/gr.101907.109>
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Ling, C., & Groop, L. (2009). Epigenetics: A molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes*, 58, 2718–2725. <http://doi.org/10.2337/db09-1003>
- Locasale, J. W. (2013). NIH Public Access. *Nature Rev Cancer*, 13(8), 572–583. <http://doi.org/10.1038/nrc3557>.Serine
- Luna López, A. (2010). Mecanismos Endógenos De Generación De Especies Reactivas De Oxígeno Y Respuesta Celular Antioxidante Ante El Estrés Oxidativo. *Envejecimiento Humano. Una Visión Transdisciplinaria*, 93–102.
- Maresca, A. (2015). Dna Methyltransferase 1 Mutations and Mitochondrial Pathology: Is Mtdna Methylated? *Frontiers in Genetics*, 6(March), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fgene.2015.00090>
- Marette, a, Dimitrakoudis, D., Shi, Q., Rodgers, C. D., Klip, a, & Vranic, M. (1999). Glucose rapidly decreases plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. *Endocrine*, 10(1), 13–8. <http://doi.org/10.1385/ENDO:10:1:13>
- Matough, F. A., Budin, S. B., Hamid, Z. A., Alwahaibi, N., & Mohamed, J. (2012). داولم او قداضلما قدسكلال في. 12(February), 5–18. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-09841-8>
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M. C., & Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), 8905–8909. <http://doi.org/10.1073/pnas.0501034102>
- Nieratschker, V., Batra, A., & Fallgatter, A. J. (2013). Genetics and epigenetics of alcohol dependence. *Journal of Molecular Psychiatry*, 1(1), 11. <http://doi.org/10.1186/2049-9256-1-11>
- Nolan, C. J., Damm, P., & Prentki, M. (2011). Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. *The Lancet*, 378(9786), 169–181. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60614-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60614-4)
- Olsen, A. S., Sarras Jr., M. P., & Intine, R. V. (2010). Limb regeneration is impaired in an adult zebrafish model of diabetes mellitus. *Wound Repair Regen*, 18(5), 532–542. <http://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00613.x>
- Olsen, A. S., Sarras, M. P., Leontovich, A., & Intine, R. V. (2012). Heritable transmission of diabetic metabolic memory in zebrafish correlates with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Diabetes*, 61, 485–491. <http://doi.org/10.2337/db11-0588>
- Patel, H., Chen, J., Das, K. C., & Kavdia, M. (2013). Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. *Cardiovascular Diabetology*, 12, 142. <http://doi.org/10.1186/1475-2840-12-142>
- Poretsky. (2010a). *Principles of Diabetes Mellitus*.
- Poretsky, L. (2010b). *Principles of diabetes mellitus. Principles of Diabetes Mellitus*. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-09841-8>
- Prasad, R. B., & Groop, L. (2015). Genetics of type 2 diabetes—pitfalls and possibilities. *Genes*, 6(1), 87–123. <http://doi.org/10.3390/genes6010087>
- Raiber. E.-A., Beraldi. D., Ficzi. G., Burgess. H. E., Branco. M. R., Murat. P., ... Balasubramanian. S. (2012).

- Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in embryonic stem cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase. *Genome Biology*, 13, R69. <http://doi.org/10.1186/gb-2012-13-8-r69>
- Ramiro, A. R., & Barreto, V. M. (2015). Activation-induced cytidine deaminase and active cytidine demethylation, 40(3).
- Reiling, E., Ling, C., Uitterlinden, A. G., Van't Riet, E., Welschen, L. M. C., Ladenvall, C., ... 'T Hart, L. M. (2010). The association of mitochondrial content with prevalent and incident type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(4), 1909–1915. <http://doi.org/10.1210/jc.2009-1775>
- Rodríguez-Dorantes, M., Téllez-Ascencio, N., Cerbón, M. A., Lez, M., & Cervantes, A. (2004). Metilación del ADN: Un fenómeno epigenético de importancia Médica. *Revista de Investigacion Clinica*.
- Rönn, T., Volkov, P., Davegårdh, C., Dayeh, T., Hall, E., Olsson, A. H., ... Ling, C. (2013). A Six Months Exercise Intervention Influences the Genome-wide DNA Methylation Pattern in Human Adipose Tissue. *PLoS Genetics*, 9(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003572>
- Sanz, L. a, Kota, S. K., & Feil, R. (2010). Genome-wide DNA demethylation in mammals. *Genome Biology*, 11(3), 110. <http://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-110>
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1412–1417. <http://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. a, Nilsa, R.-D. V., & Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(8), 1343–1374. <http://doi.org/10.1089/ars.2007.1957>
- Villeneuve, L. M., Reddy, M. a., & Natarajan, R. (2011). Epigenetics: Deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 38(January), 401–409. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05497.x>
- Volkmar, M., Dedeurwaerder, S., Cunha, D. a, Ndlovu, M. N., Defrance, M., Deplus, R., ... Fuks, F. (2012). DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *The EMBO Journal*, 31(January), 1405–1426. <http://doi.org/10.1038/emboj.2011.503>
- Volkmar, M., Dedeurwaerder, S., Cunha, D. A., Ndlovu, M. N., Defrance, M., Deplus, R., ... Eizirik, D. L. (2012). DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients, (January), 1405–1426. <http://doi.org/10.1038/emboj.2011.503>
- Zaidi, S. K., Young, D. W., Montecino, M., Lian, J. B., Stein, J. L., van Wijnen, A. J., & Stein, G. S. (2010). Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information. *Molecular and Cellular Biology*, 30(20), 4758–66. <http://doi.org/10.1128/MCB.00646-10>
- Zhu, J.-K. (2009). Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual Review of Genetics*, 43, 143–166. <http://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134205>

Bibliografía ONLINE

- ADA, 2015. Asociación Americana de Diabetes. Disponible online en <http://www.diabetes.org/es/>
- CCDs, 2016. Consensus CDS protein data base. Disponible online en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi>
- DANE, 2016. Departamento de Administrativos Nacional de estadísticas. Disponible online <http://www.dane.gov.co>
- IDF, 2016. Federación Internacional de Diabetes. Disponible online en <http://www.idf.org>
- NCBI, 2016. National Center for Biotechnology Infomation. Disponible online en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406904>
- OMIM, 2016. Online Mendelian Inheritance in Man. Disponible online en <http://www.omim.org>
- OMS, 2016. Organización Mundial de la Salud. Disponible online en <http://www.who.int/es/>

XIII. ANEXOS

13.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LA DIABETES

13.1.1 Datos mundiales

La diabetes mellitus es un problema de salud pública grave y creciente a nivel mundial, que provoca una reducción en la expectativa de vida y aumento de la morbilidad debido a las complicaciones específicas que genera la enfermedad (Ceriello, 2008). Es una de las enfermedades de mayor importancia en todo el mundo, por ser una de las patologías no transmisibles más frecuentes y por la severidad y diversidad de sus complicaciones crónicas. En los últimos 25 años se ha incrementado de manea dramática y su prevalencia varía según la población y el número de estudios que describen las frecuencias en los distintos entornos sociales y geográficos (Sierra *et al.* 2006).

El centro de prensa de la Organización Mundial de la Salud (OMS), anunció los últimos datos y cifras de personas con diabetes en Septiembre del pasado año. La OMS estima que en el mundo hay más de 347 millones de personas con diabetes. Más del 80% de las muertes se registran en países de bajo y de medio recurso económico. Se calculó que en el 2004 fallecieron más de 3.4 millones de personas como consecuencia del exceso de azúcar en sangre y que para el 2030, la diabetes será la séptima causa de mortalidad con más de 400 millones de afectados (Online OMS, 2015; Villeneuve et al. 2011).

Según la Federación Internacional de Diabetes, más de la mitad de los posibles casos aún no han sido identificados, una estimación de 4.8 millones de personas mueren al año y su número de afectados va en aumento en todos los países (Online IFD, 2015). La T2DM, es el tipo más común entre las diferentes clases de diabetes. Millones de americanos han sido diagnosticados con esta enfermedad y muchos no se han percatado del alto riesgo que se enfrentan. Existen grupos con mayor riesgo de padecer diabetes tipo dos que otros, como es el caso de América Latina. Según la Federación Internacional de diabetes, la incidencia de la comunidad latina va en aumento y tiene tasas dos veces más altas que los no latinos (Online IDF, 2014).

	2010		2030		Percentage increase in number
	Number of adults with diabetes (million)	Prevalence (%)*	Number of adults with diabetes (million)	Prevalence (%)*	
Africa	12.1	3.8%	23.9	4.7%	98.1%
EMME	26.6	9.3%	51.7	10.8%	93.9%
Europe	55.4	6.9%	66.5	8.1%	20.0%
North America	37.4	10.2%	53.2	12.1%	42.4%
South and Central America	18.0	6.6%	29.6	7.8%	65.1%
Southeast Asia	58.7	7.6%	101.0	9.1%	72.1%
West Pacific	76.7	4.7%	112.8	5.7%	47.0%
Worldwide	284.8	6.4%	438.7	7.7%	54.1%

Adapted from reference 1 with permission of Shaw and colleagues. * EMME=Eastern Mediterranean and Middle East. *For each region values are standardised to world age distribution for that year.

Table 1: Estimated numbers of adults aged 20–79 with any type of diabetes mellitus and prevalence, by region, in 2010 and 2030

Tabla 26. Estimación de prevalencia de diabetes para el 2030.

13.1.2 Datos en Colombia

En Colombia, su incidencia anual va en aumento y su prevalencia oscila entre el 4 - 8% en zonas urbanas y el 2% en zonas rurales, en función del rango y edad de la población estudiada. Múltiples factores genéticos

y ambientales como el cambio en los estilos de vida, el envejecimiento, el mestizaje y la urbanización han impulsado el aumento de sobrepeso y el síndrome metabólico contribuyendo así a su patogenidad y persistencia. En el 2007 el Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas (DANE), informó que la diabetes se encuentra dentro de la primeras cinco causas de muerte anuales y es cuatro veces más frecuente en la población urbana que en la rural. La prevalencia de T1DM es del 0.07% y su incidencia es de 3-4 por 100,000 niños menores a 15 años (Aschner, 2010).

13.1.3 Posibles Causas epidemiológicas

Las posibles causas de la epidemia de la diabetes se deben a múltiples factores genéticos, sociales y ambientales. Las modificaciones en los estilos de vida tras la industrialización y globalización de las sociedades han conllevado a la decadencia en la actividad física no programada y al fácil acceso a alimentos ricos en energía con un mínimo esfuerzo. Incrementando así la adiposidad corporal, desarrollando resistencia a la insulina que termina por desbordar la capacidad pancreática y desencadenar la T2DM en individuos genéticamente susceptibles. El incremento de la longevidad tras el control de las enfermedades infecciosas entre otras, han permitido una mayor expectativa de vida y un envejecimiento relativo. La prevalencia de la DM incrementa con la edad y a medida que somos más longevos su prevalencia global aumenta (Sierra *et al.* 2006).

Las hipótesis del genotipo y fenotipo ahorrador, aumentan la prevalencia de la diabetes en personas susceptibles. Personas con un genotipo económico se ha descrito en comunidades rurales que pasan de un estilo de vida marcado por la actividad física y la restricción calórica a otro caracterizado por el sedentarismo y la alta ingesta calórica al moverse a la ciudad. Las comunidades humanas han de pasar por épocas enfrentándose por medio hostil de escases de alimentos y necesidades de desplazarse a pie, cambiando la capacidad de almacenamiento de la energía caracterizándose en individuos que gastan poco y almacenan eficientemente en tiempos de escasez. La hipótesis del fenotipo ahorrador se ha estudiado en niños con bajo peso al nacer, que tienen mayor riesgo de desarrollar T2DM y obesidad dado a las condiciones de privación de nutrientes en el útero que sobreviven por generar un fenotipo ahorrador. Al llegar a la edad adulta posee un aporte calórico superior al que su cuerpo requiere, desarrollando así la obesidad, resistencia a la insulina y T2DM (Sierra *et al.*, 2006).

13.2 GRANDES ESTUDIOS DE DIABETES EN LA POBLACION HUMANA

Una de las preguntas y problemas que han acompañado en el tratamiento de la diabetes se debe a la relación que hay entre el control glucémico y el desarrollo de las complicaciones de la diabetes. Diversos estudios han evidenciado el papel de anomalías metabólicas y las complicaciones, y se ha concluido que un control glucémico meticuloso podría prevenir el desarrollo de dichas complicaciones. Dos estudios de cohortes mostraron el efecto que tiene este control en la prevención y/o retraso de las complicaciones y en la memoria metabólica del individuo (Poretsky, 2010).

13.2.1 *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)*

El *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) fue un estudio multicéntrico importante que se realizó por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) y el Instituto de Diabetes y Digestión y de Enfermedades del Riñón (NIDDK) entre 1983-1993. Se diseñó este estudio para evaluar si el control estricto de la glucosa puede prevenir o reducir la tasa de progresión de las complicaciones de la diabetes a un largo plazo. El DCCT involucro a 1,441 voluntarios entre los 13-39 años de edad con T1DM y 39 centros entre los Estados Unidos y Canadá. Los criterios de inclusión de los voluntarios es que debían tener diabetes por lo menos 1 año y no más de 15 años, y que no tuvieran presencia de patologías.. El estudio comparo los efectos estándares de los niveles de glucosa versus un control intensivo de glucosa con

valores de HbAc1 menores a 6.0 y mantener glucosa en sangre entre los 70-120mg/dL y un grupo convencional con control normal manteniendo la glucosa por debajo de 180mg/dL postprandial (Diabetes & Clearinghouse, 1993; Poretsky, 2010a).

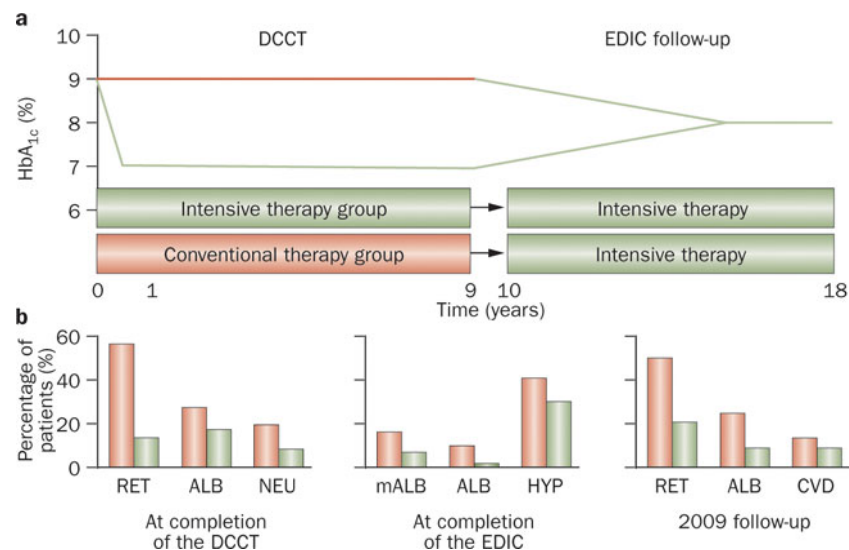


Figura 40. DCCT y EDIC (Pirola *et al.*, 2010).

En ambos tratamientos los valores medio de glucosa se mantuvieron en 155mg/dL en el tratamiento intensivo y 231mg/dL en tratamiento convencional. Los resultados se discuten en tabla a continuación.

Resultados de la DCCT:
Control Intensivo de la Glucosa Reduce:
76% de riesgo de enfermedades del ojo
50% de riesgo de enfermedades en riñones
60% de riesgo de enfermedades del nervio

Tabla 27. Resultados de la DCCT (Diabetes & Clearinghouse, 1993).

13.2.2 Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC)

Al finalizar el DCCT los investigadores continuaron evaluando las implicaciones a largo plazo y nació el estudio epidemiológico llamado *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) que siguió con más del 90% de los pacientes. Este estudio de seguimiento se enfoco en evaluar la incidencia y predecir los eventos cardiovasculares como infarto cardiaco, accidentes cerebrovasculares o la necesidad de cirugía de corazón así como las otras complicaciones relacionadas como daño en la visión, riñones y nervios. También evalúa el impacto de la calidad de vida y el costo efectivo entre los dos tratamiento. El EDIC realizó el seguimiento cambiando a los del tratamiento convencional al tratamiento intensivo (Diabetes & Clearinghouse, 1993; Poretsky, 2010a).

Resultados de la EDIC
Control glucémico intensivo reduce
42% de cualquier evento cardiovascular
57% de ataque cardiaco, accidentes cerebrovasculares

Tabla 28. Resultados de EDIC (Diabetes & Clearinghouse, 1993).

	Complications assessed	Main findings
Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications study (2009) ¹²²	Cardiovascular disease, nephropathy, retinopathy	The frequencies of serious complications in patients with type 1 diabetes, especially when treated intensively, are lower than those reported historically
Finnish Diabetic Nephropathy (FinnDiane) Study (2009) ¹²³	Cardiovascular disease, nephropathy	In patients with type 1 diabetes, variations in glycated haemoglobin concentration predicted the incidence of microalbuminuria and progression to renal disease, and incidence of cardiovascular disease
DCCT/ Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study (2011) ¹²⁴	Nephropathy	In patients with type 1 diabetes and persistent microalbuminuria, intensive glycaemic control, blood pressure control, and favourable lipid panels lead to fewer long-term renal complications
FinnDiane (2009) ¹²⁵	Nephropathy	An independent and graded association exists between the presence and severity of kidney disease and premature mortality in type 1 diabetes
Genetics of Diabetes in Kidney Collection (2009) ¹²⁶	Nephropathy	Identified genes associated with susceptibility to diabetic nephropathy, near the <i>FRMD3</i> and <i>CARS</i> loci
Swedish Renal Registry (2010) ¹²⁷	Nephropathy	Substantial differences in risk for nephropathy in male versus female patients with type 1 diabetes, with age at diagnosis an important factor (early diagnosis lowers risk)
DCCT/EDIC (2009) ¹²⁸	Autonomic neuropathy	Patients given intensive insulin therapy had less cardiac autonomic neuropathy than those who received conventional treatment
Acetyl-L-carnitine Clinical Trials (2009) ¹²⁹	Neuropathy	Raised triglycerides correlate with progression of diabetic neuropathy
DCCT/EDIC (2008) ¹³⁰	Retinopathy	Intensive insulin therapy (vs conventional therapy) reduces development and progression of diabetic retinopathy, with a treatment-related difference (metabolic memory) continuing for at least 10 years
Diabetic RETinopathy Candesartan Trials (DIRECT; 2008) ¹³¹	Retinopathy	The angiotensin receptor blocker, candesartan, reduces retinopathy development but does not stop retinopathy progression
Table 1: Large-scale studies on prediction and prevention of complications associated with type 1 diabetes		

Tabla 29. Mayores descubrimientos por los estudios mundiales más importantes (Nolan et al., 2011).

13.2.3 The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)

En 1998 se realizó el estudio más grande, *The United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) que fue diseñado para observar los efectos del control de la glucemia en complicaciones a largo plazo en pacientes T2DM. Se reclutaron 5,102 pacientes con diagnóstico reciente y se les hizo un seguimiento de 11 años. Se comparó dos tratamientos, un tratamiento intensivo que consistía en aplicación de insulina o antidiabéticos orales o ambos manteniendo los niveles de HbA_{1c} por debajo de 7.0% y se comparó con la terapia convencional con dieta y si era necesario terapia farmacológica y niveles promedio de HbA_{1c} de 7.9%. Los resultados en el tratamiento intensivo mostraron una reducción en el riesgo de muerte súbita, muerte por hiperglucemia, infartos miocardio, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, amputaciones, hemorragia vítrea, fotocoagulación de la retina, ceguera o cataratas en un 12 %. La reducción de riesgo de retinopatías fue del 21% y el aspecto de microalbuminuria se redujo un 30%. La reducción en la presión arterial no disminuyó significativamente en comparación a las complicaciones microvasculares y macrovasculares que se redujeron un 37% y 34% respectivamente (Poretsky, 2010a).

En resumen todos los estudios realizados en dichas cohortes, demostraron que un control glucémico en los estadios temprano de la enfermedad, junto a un control en la presión sanguínea y los niveles de lípidos, previene y reducen de manera significativa las complicaciones macro y microvasculares en la T1DM y T2DM.